

---

# ANNALES DE L'INSTITUT PASTEUR

---

## Nouvelle contribution à l'étude de la Vaccination des bovidés contre la tuberculose

PAR MM. A. CALMETTE ET C. GUERIN

Institut Pasteur de Lille.

---

Plusieurs expériences relatées dans un précédent mémoire <sup>1</sup> nous avaient convaincus de la possibilité de conférer aux jeunes bovins et aux bovins adultes une résistance très marquée à l'égard de l'infection tuberculeuse artificielle par les voies digestives. Cette résistance peut s'obtenir en faisant ingérer, au moyen d'une sonde œsophagienne et suivant une technique que nous avons décrite, des émulsions fines de bacilles tuberculeux d'origine bovine, virulents ou modifiés par le chauffage à 70°.

Une seule ingestion de bacilles *virulents*, à la dose de 0<sup>gr</sup>,05 chez les jeunes bovins, ou de 0<sup>gr</sup>,25 chez les bovins adultes, suffit en général à infecter assez légèrement ces animaux pour qu'après avoir réagi à la tuberculine pendant 1, 2 ou 3 mois, ils cessent de réagir et deviennent capables de résister pendant plusieurs mois à des ingestions massives ou répétées de doses de bacilles tuberculeux sûrement infectantes pour les témoins.

On doit se demander s'il s'agit là d'une immunité réelle, de durée plus ou moins longue, affirmée non seulement par l'absence de réaction à la tuberculine, — qui n'est pas suffisamment démonstrative, — mais aussi par la non persistance de bacilles virulents dans les différents groupes ganglionnaires de l'organisme de ces animaux.

1. Ces *Annales*, juillet 1907, p. 525.

Pour élucider cette question de capitale importance, nous avons choisi, parmi ceux de nos bovins qui avaient servi aux expériences de vaccination par les voies digestives, 4 génisses bretonnes de 18 mois, auxquelles nous avons fait ingérer 2 doses de 0<sup>gr</sup>,10 et 0<sup>gr</sup>,25 de bacilles virulents d'origine bovine les 11 août et 31 octobre 1906. Du 3 au 23 juillet 1907, 8 mois après la dernière ingestion bacillaire, aucun de ces animaux n'ayant réagi à la tuberculine, nous leur avons fait absorber, à 5 jours d'intervalle, 5 doses successives de 0<sup>gr</sup>,10 de bacilles finement émulsionnés (soit 0<sup>gr</sup>,50 au total).

Soumises à l'épreuve tuberculine les 11 septembre et 10 octobre suivants, aucune de ces génisses ne présenta d'élévation de température.

Nous décidons d'en sacrifier 2 à la fin du 3<sup>e</sup> mois, et les 2 autres à la fin du 6<sup>e</sup> mois après l'épreuve.

Des témoins d'autres expériences nous avaient montré que les bovins neufs, infectés dans les mêmes conditions par l'ingestion de doses successives suffisamment rapprochées, et sacrifiés plus tard à des intervalles variables de 1 à 6 mois, contractent toujours des lésions tuberculeuses, au moins ganglionnaires, souvent ganglionnaires et pulmonaires, virulentes pour le cobaye.

Les deux premières génisses (n<sup>os</sup> 79 et 98) abattues à la fin du *troisième mois*, le 23 octobre 1907, ont tous les organes parfaitement sains. On ne relève, ni dans les différents groupes ganglionnaires, ni dans les poumons, aucun tubercule. Les ganglions mésentériques, bronchiques, médiastinaux et rétro-pharyngiens sont prélevés séparément, triturés et inoculés à 16 cobayes, sous la peau de la cuisse. Un seul prend la tuberculose et meurt le 82<sup>e</sup> jour. Il avait reçu l'émulsion de ganglions mésentériques. Tous les autres sont restés indemnes.

Les deux autres génisses (n<sup>os</sup> 82 et 220) abattues à la fin du *sixième mois*, le 24 janvier 1908, sont trouvées également indemnes de toute lésion tuberculeuse apparente. Les différents groupes ganglionnaires, prélevés aseptiquement, triturés et émulsionnés, sont inoculés comme précédemment à 16 cobayes qui restent tous indemnes par la suite. Aucun d'entre eux n'a présenté la moindre adénite inguinale suspecte.

Donc les bacilles absorbés après les repas virulents d'épreuve,



chez les bovins antérieurement guéris d'une légère infection tuberculeuse d'origine digestive, sont *entièrement détruits* au bout de 4 à 6 mois et, déjà à la fin du 3<sup>e</sup> mois, il n'en subsiste que quelques-uns dans les ganglions mésentériques.

Cette constatation est surtout intéressante à retenir parce que nous verrons tout à l'heure qu'il en va tout autrement lorsque les bacilles d'épreuve sont introduits, non plus par le tractus digestif, mais par la voie veineuse.

Elle nous montre d'autre part que les ganglions mésentériques remplissent, à l'égard de l'infection tuberculeuse comme vis-à-vis de beaucoup d'autres infections d'origine intestinale, un rôle protecteur particulièrement efficace.

Nous espérons pouvoir bientôt en élucider le mécanisme.

Est-ce à dire que les bovins qui se sont ainsi débarrassés des bacilles virulents précédemment ingérés possèdent une aptitude suffisante à résister aux infections naturelles ou artificielles pour qu'on puisse les considérer comme *vaccinés* ?

Nous ne pourrions l'affirmer qu'en démontrant que ces animaux échappent par la suite à l'infection artificielle par voie sanguine, ou à l'infection naturelle par cohabitation étroite et prolongée avec d'autres bovidés porteurs de lésions tuberculeuses ouvertes, tandis que des bovidés neufs servant de témoins et placés dans les mêmes conditions prennent la tuberculose.

Or, nous avons essayé de réaliser cette dernière expérience en parquant en liberté dans une même étable, avec 4 bovins tuberculeux (porteurs de lésions ouvertes) et 10 témoins, 20 génisses âgées de six mois à un an, qui avaient ingéré à la sonde œsophagienne 0<sup>gr</sup>,50 de tuberculose bovine chauffée 10 minutes à 70° et, deux mois plus tard, 0<sup>gr</sup>,10 de tuberculose bovine virulente. Au bout de quatre mois, aucun des sujets vaccinés ne réagissait à la tuberculine et 6 témoins sur 10 fournissaient une réaction positive. Pendant ce temps les bovidés infectés succombèrent et il nous fut impossible de les remplacer. Tuberculinés de nouveau au sixième mois, nous constatâmes avec surprise qu'aussi bien dans le lot des vaccinés que dans celui des témoins, aucun animal ne réagissait plus. C'est donc que les témoins primitivement contaminés, mais n'ayant pas subi assez longtemps ou d'une manière

assez intime le contact avec les malades, étaient apparemment guéris. Une nouvelle tuberculation au huitième mois donna le même résultat. Par suite, il nous est impossible de tirer de cette expérience aucun enseignement utile au point de vue de la *durée de l'immunité* conférée par les ingestions vaccinales, et il est nécessaire que l'épreuve soit renouvelée sur d'autres animaux, en aggravant les conditions de contamination.

Mais, en même temps que nous poursuivions les essais qui précèdent, nous décidâmes d'affecter six de nos bovidés anciennement vaccinés par les voies digestives, et deux bovidés *neufs*, à une autre expérience ayant pour objet de rechercher si les vaccinés sont capables de résister, 8 mois et 1 an après un repas infectant d'épreuve resté inoffensif, à l'inoculation *intraveineuse* de 5 milligrammes de bacilles virulents. C'est cette expérience, beaucoup plus démonstrative, que nous allons maintenant rapporter.

\* \* \*

Dans notre précédent mémoire nous relations l'histoire de 7 vaches adultes qui, après avoir ingéré à diverses reprises soit des bacilles chauffés à 70°, soit des bacilles d'origine équine, soit des bacilles virulents d'origine bovine, avaient ultérieurement résisté à l'ingestion massive de 1 gramme de bacilles bovins virulents et finement émulsionnés. L'une de ces vaches (n° 7), sacrifiée 36 jours après ce repas infectant d'épreuve, était trouvée indemne de tuberculose. Ses différents groupes ganglionnaires furent inoculés à 28 cobayes. Tous restèrent indemnes, sauf un seul qui avait reçu le triturat des ganglions *mésentériques*. Ce sont les 6 autres vaches de cette série que nous avons réservées pour subir l'épreuve par inoculation *intraveineuse*. A aucun moment, depuis le 6 novembre 1906, date à laquelle elles ont fait leur dernier repas infectant avec 1 gramme de bacilles, elles n'ont présenté la moindre réaction tuberculinique.

Trois d'entre elles (nos 2, 3 et 5) ont reçu le 6 juillet 1907, 8 mois après ce dernier repas infectant, 5 milligrammes de bacilles virulents (origine lait, de Nocard) dans la veine jugulaire, en même temps qu'une vache témoin du poids de 440 kilogrammes, préalablement éprouvée à la tuberculine et reconnue indemne.



Les 3 dernières (n<sup>os</sup> 1, 4 et 6) reçurent également dans la veine jugulaire la même dose de bacilles virulents, le 6 novembre 1907, exactement *une année* après leur dernier repas infectant. Une autre vache neuve pesant 474 kilogrammes et indemne de tuberculose leur servit de témoin.

Chez les 2 témoins, l'évolution de la maladie fut identique. La température, restée sensiblement normale pendant les 11 et 13 premiers jours, s'éleva brusquement et se maintint aux environs de 40°, 5, en même temps que des symptômes d'infection granulique aiguë se manifestaient : amaigrissement rapide, perte de l'appétit, respiration accélérée (40 à 45 par minute). Le premier témoin meurt le 29<sup>e</sup> jour, ayant perdu 75 kilogrammes. Le second succombe le 30<sup>e</sup> jour, ayant perdu 44 kilogrammes.

A l'autopsie on trouve chez tous deux les poumons farcis d'innombrables tubercules gros comme une tête d'épingle, translucides pour la plupart, quelques-uns déjà caséux au centre. Les lobes antérieurs sont totalement hépatisés. Les ganglions bronchiques et médiastinaux énormes, farcis de petits tubercules en voie de ramollissement. Tous les viscères abdominaux sont sains.

Par contre, les trois vaches de la première série et les trois de la seconde, après une courte période de malaise, restent en apparence parfaitement indemnes. Nous décidons de les sacrifier à des intervalles successifs de 6, 7, 8 et 10 mois après l'épreuve intraveineuse. Voici pour chacune d'elles un court résumé de leur observation avec les résultats de l'autopsie et des inoculations expérimentales consécutives.

#### PREMIÈRE SÉRIE.

*Vaches éprouvées par injection intraveineuse 8 mois après la dernière ingestion virulente.*

*Vache n<sup>o</sup> 2.* — 36 heures après l'injection intraveineuse de 5 milligrammes de bacilles virulents, la température commence à s'élever et atteint 40°, 5 le soir du 5<sup>e</sup> jour. Respiration très accélérée (40 à la minute). Toux fréquente, courte ; perte d'appétit. Puis la température s'abaisse et redevient normale le 11<sup>e</sup> jour. Nouvelle poussée fébrile le 13<sup>e</sup> jour, allant jusqu'à 40° le 17<sup>e</sup>, avec réapparition de la toux. Le 23<sup>e</sup> jour l'état général est satisfaisant. Tous les symptômes alarmants ont disparu. L'animal reste en parfaite santé jusqu'au jour de l'abatage fixé au 6 janvier 1908, juste

6 mois après l'épreuve. La veille, une injection de tuberculine ne provoque aucune réaction.

*Autopsie.* — Ganglions mésentériques normaux. Les coupes microscopiques n'y montrent ni tubercules ni bacilles. Ganglions bronchiques et médiastinaux volumineux, mais sans lésions visibles. Ganglions rétropharyngiens et poumons parfaitement sains.

4 cobayes inoculés sous la peau de la cuisse avec le triturat des ganglions mésentériques restent indemnes.

12 cobayes inoculés avec le triturat des ganglions bronchiques et médiastinaux deviennent tous tuberculeux.

*Vache n° 3.* — La température s'élève progressivement à partir de la 36<sup>e</sup> heure après l'inoculation virulente pour atteindre, le soir du 5<sup>e</sup> jour, 40°, 4. Respiration accélérée (40 par minute). Toux fréquente. La température s'abaisse ensuite peu à peu et revient à la normale le 10<sup>e</sup> jour, en même temps que les symptômes s'amendent. Le 15<sup>e</sup> jour, nouvelle poussée fébrile avec maximum de 39°, 4 le 18<sup>e</sup> jour. Retour à la normale le 22<sup>e</sup> jour. Depuis cette époque et jusqu'au jour de l'abatage, le 6 février 1908, 7 mois après l'épreuve, la santé de l'animal demeure parfaite. De 540 kilogrammes au début de l'expérience, son poids s'est accru jusqu'à 595 kilogrammes.

Tuberculinée 24 heures avant la mort, cette vache ne présente aucune réaction.

*Autopsie.* — Ganglions mésentériques plus volumineux qu'à l'état normal, durs, avec flocs fibreux dans la couche corticale mais sans tubercules caséifiés ni calcifiés. Les coupes microscopiques n'y montrent ni bacilles ni cellules géantes. Ganglions bronchiques et médiastinaux de même apparence. Les poumons sont complètement sains : on n'y perçoit aucune trace de lésions tuberculeuses récentes ou anciennes.

16 cobayes sont inoculés avec les groupes ganglionnaires mésentériques, rétro-pharyngiens, bronchiques et médiastinaux.

Les 8 qui ont reçu le triturat des deux premiers groupes restent indemnes. Les 4 inoculés avec les ganglions bronchiques et 2 sur 4 inoculés avec les ganglions médiastinaux deviennent tuberculeux.

*Vache n° 5.* — La température s'élève seulement le 4<sup>e</sup> jour après l'inoculation intraveineuse (40° 2). Accélération de la respiration. Râles humides sur toute la hauteur des deux poumons. Toux fréquente. Le 10<sup>e</sup> jour la température redevient normale et la santé parfaite jusqu'au jour de l'abatage fixé au 15 mai 1908, un peu plus de 10 mois après l'épreuve. Poids : 540 kilogrammes au début ; 550 le jour de la mort. Aucune réaction à la tuberculine la veille de l'abatage.

*Autopsie.* — Tous les organes sont parfaitement sains et ne montrent pas la moindre lésion ancienne ou récente.

4 cobayes inoculés sous la peau de la cuisse avec le triturat des ganglions mésentériques restent indemnes. 12 autres inoculés avec les triturats des ganglions bronchiques et médiastinaux deviennent tuberculeux.



## DEUXIÈME SÉRIE.

*Vaches éprouvées par inoculation intraveineuse 12 mois après la dernière ingestion virulente.*

*Vache n° 6.* — La température s'élève le soir du 4<sup>e</sup> jour (40°, 1) et atteint son maximum le soir du 5<sup>e</sup> (40°, 2).

Diminution de l'appétit. Légère accélération de la respiration et quelques efforts de toux. Le 8<sup>e</sup> jour, l'état général est redevenu parfait et l'animal reste en bonne santé pendant 8 mois, sa température prise matin et soir demeurant normale. Le 1<sup>er</sup> juin 1908, celle-ci s'élève à 39°, 8. Le 3 juin, on constate une induration assez accusée des deux quartiers gauches de la mamelle. (Or cette vache arrivée à l'Institut plus de deux ans auparavant, le 12 mars 1906, était à bout de lait, avait les mamelles intactes et ne réagissait pas à la tuberculine). Très rapidement les symptômes s'aggravent du côté du pis. Les 6 et 9 juin les deux autres quartiers se prennent à leur tour. Le 18, la mamelle a acquis un volume considérable; elle est dure, très sensible. L'état général devient moins bon; l'animal maigrit: il a perdu 17 kilogrammes depuis le 1<sup>er</sup> juin. On extrait par pression d'un quartier quelques gouttes de muco-pus dont l'examen microscopique montre une véritable purée de bacilles tuberculeux.

Nous décidons l'abatage qui a lieu le 26 juin. Cette vache, de très belle apparence et très grasse, pèse 710 kilogrammes.

*Autopsie.* — Mammite suraiguë des 4 quartiers. Ganglions rétromammaires infiltrés de tubercules en voie de caséification. Organes abdominaux parfaitement sains. Sur les poumons on trouve une vingtaine de tubercules petits, manifestement d'origine récente. Quelques-uns commencent à se caséifier au centre. Ganglions bronchiques et médiastinaux un peu augmentés de volume, mais sans lésions tuberculeuses visibles à l'œil nu.

Voici donc un animal rendu manifestement très résistant à l'infection tuberculeuse puisqu'il a supporté victorieusement une épreuve qui fait périr les témoins par granulie aiguë en un mois. Il reste en parfaite santé apparente pendant 8 mois. Puis, tout à coup, sans doute au moment où la résistance qui lui avait été artificiellement conférée s'épuise, — comme il a conservé dans son organisme des bacilles vivants, — ceux-ci (peut-être sous l'influence d'un rut passager) créent tout à coup dans la mamelle une lésion grave. Nous voyons alors évoluer spontanément en quelques jours une mammite tuberculeuse d'origine sûrement vasculaire, car cette vache, parfaitement isolée, ne se trouvait exposée à aucune cause de contagion venant de l'extérieur.

C'est la première fois, croyons-nous, qu'une expérience de ce genre — d'ailleurs involontaire — se trouve réalisée. Jus-

qu'à présent on n'avait jamais réussi à provoquer l'apparition d'une mammite tuberculeuse autrement que par l'inoculation ou l'insertion directe de bacilles dans les trayons.

L'accident survenu à cette vache nous détermina à sacrifier immédiatement les deux derniers animaux de notre seconde série, car nous sommes fondés à croire que, chez eux aussi, l'immunité passagère conférée par l'ingestion d'épreuve du 6 novembre 1906 a disparu.

On soumet donc les n<sup>os</sup> 1 et 4, le 26 juin 1908, à l'épreuve de la tuberculine. Le n<sup>o</sup> 1 réagit violemment (2<sup>o</sup>, 2). Le n<sup>o</sup> 4 ne réagit pas.

L'abatage de ces deux vaches a lieu le 27 juin. Voici leurs observations et leurs protocoles d'autopsie :

*Vache n<sup>o</sup> 1.* — Dès la huitième heure après l'inoculation intraveineuse de 5 milligrammes de bacilles, le 6 novembre 1907, on note une ascension de température qui atteint son maximum le 5<sup>e</sup> jour (40<sup>o</sup>, 4), en même temps que se manifestent quelques symptômes peu graves du côté des poumons : respiration légèrement accélérée; quelques efforts de toux. Le 8<sup>e</sup> jour, la température est redevenue normale. Depuis ce moment jusqu'au jour de l'abatage (27 juin 1908), 7 mois et demi après l'épreuve, la santé reste parfaite. Poids : 550 kilogrammes.

*Autopsie.* — Excellent état d'embonpoint. Organes abdominaux parfaitement sains. Les poumons ne portent aucune trace de lésions tuberculeuses récentes ou anciennes. Mais le ganglion bronchique gauche, un peu augmenté de volume, montre sur la coupe un foyer tuberculeux caséifié, gros comme un grain de chènevis, et qui justifie la réaction tuberculinique présentée par cet animal avant sa mort. Les ganglions médiastinaux sont indemnes.

4 cobayes sont inoculés avec le triturat des ganglions mésentériques et quatre cobayes avec celui des ganglions bronchiques. Trente jours plus tard ces derniers seuls présentent une adénite caractéristique. Les autres restent indemnes.

*Vache n<sup>o</sup> 4.* — Ascension de température à partir de la 24<sup>e</sup> heure après l'inoculation intraveineuse. Maximum le 4<sup>e</sup> jour (41<sup>o</sup>, 6) avec respiration légèrement accélérée et un peu de toux. Le 8<sup>e</sup> jour, retour à la normale. Santé parfaite jusqu'au 27 juin 1908, 7 mois et demi après l'épreuve, date de l'abatage. Poids 605 kilogrammes.

*Autopsie.* — Animal en excellent état d'embonpoint. On ne découvre aucune trace de lésion tuberculeuse récente ou ancienne dans les organes thoraciques ou abdominaux. Les différents groupes ganglionnaires soigneusement examinés ne présentent rien de suspect.

16 cobayes sont inoculés sous la peau de la cuisse avec le triturat des ganglions mésentériques, bronchiques et médiastinaux. 8 d'entre eux, qui avaient reçu l'émulsion des ganglions bronchiques ou médiastinaux, présen-



tent l'adénite caractéristique 30 jours après. Les autres sont indemnes.

En résumé, ces six vaches adultes, qui avaient manifestement acquis une résistance très grande à l'infection par la voie digestive, ont supporté l'épreuve particulièrement grave d'inoculation intraveineuse sans se tuberculiser tout d'abord, tandis que les deux vaches témoins, inoculées en même temps avec la même dose de bacilles (5 milligrammes), ont succombé en 29 et 30 jours avec des lésions de granulie aiguë. Les bacilles virulents introduits dans leur circulation sanguine se sont montrés, chez elles, incapables de produire des tubercules aussi longtemps que l'immunité partielle qui leur avait été conférée a persisté, c'est-à-dire pendant 7 à 8 mois après l'épreuve, ou pendant 18 à 20 mois après la dernière ingestion virulente.

Mais ces bacilles, drainés ou collectés par les groupes ganglionnaires les plus voisins du poumon (bronchiques et médiastinaux), y sont restés indéfiniment vivants sans que leur présence se signalât par aucun trouble physiologique et *sans même qu'elle fût révélée par la réaction tuberculinique*, jusqu'au moment où, l'immunité ayant peu à peu disparu, ils ont pu se multiplier et constituer des lésions tuberculeuses. L'exemple des vaches n° 6 et n° 1 de la seconde série est tout à fait démonstratif à cet égard. Si nous avions attendu davantage avant d'abattre les quatre autres vaches des deux séries, il est infiniment probable que nous eussions assisté à des réveils d'infection analogues, puisque toutes conservaient encore dans leurs ganglions de la cavité thoracique des bacilles vivants capables de tuberculiser le cobaye.

Il semble donc qu'on ne puisse prétendre en aucune manière conférer aux bovidés l'immunité contre la tuberculose par inoculation *intraveineuse* d'une petite quantité — si faible soit-elle — de bacilles vivants provenant de cultures artificielles. Ceux-ci peuvent rester inoffensifs pour l'organisme pendant de longs mois et n'y développer aucune lésion tuberculeuse; mais l'animal qui les porte ne s'en débarrasse pas, et sous les influences diverses capables, soit de triompher d'une immunité antérieurement acquise, soit de diminuer la résistance normale du sujet, ils sont susceptibles d'engendrer tout à coup des désordres plus ou moins graves.

Les expériences relatées ci-dessus nous font clairement

comprendre pourquoi les méthodes de vaccination des bovidés proposées par *Von Behring* depuis 1902 ne mettent que pour un temps très limité ces animaux à l'abri des infections artificielles ou spontanées. *Elles ne confèrent pas une véritable immunité*, parce que les bacilles de cultures artificielles, introduits par voie veineuse dans le torrent circulatoire, *au lieu d'être résorbés, restent en état de vie latente dans les ganglions de la cavité thoracique.*

Par contre, lorsque ces mêmes bacilles sont introduits, comme nous l'avons indiqué, à l'état d'émulsion fine *par la voie digestive*, — soit atténués par le chauffage, soit vivants mais en quantité insuffisante pour infecter rapidement l'organisme, — *ils se résorbent* et sont détruits en totalité dans les ganglions mésentériques en un temps relativement court, qui ne paraît pas excéder 4 à 6 mois.

*Cette résorption totale des bacilles confère incontestablement aux bovidés un état d'immunité relative*, puisque non seulement ils résistent après 8 et 10 mois aux épreuves d'ingestions massives et répétées de bacilles vivants et virulents, mais que, *même après l'épreuve particulièrement grave d'inoculation intraveineuse effectuée 8 à 12 mois après le dernier repas vaccinant*, ils gardent encore pendant 7 à 8 mois au moins toutes les apparences d'une parfaite santé, alors que les témoins succombent en quelques semaines à la granulie aiguë.

Nos expériences montrent que cette immunité relative, conférée aux bovidés par les voies digestives, peut être affirmée et même mesurée en quelque sorte par la manière dont les animaux réagissent à l'épreuve d'inoculation intraveineuse.

Alors qu'à la suite de celle-ci les animaux neufs, servant de témoins, ne manifestent aucune réaction thermique pendant les 10 ou 12 premiers jours, on constate au contraire que la température des vaccinés s'élève presque immédiatement de la 36<sup>e</sup> heure au 4<sup>e</sup> jour après l'inoculation, en s'accompagnant de toux et de troubles respiratoires.

Cette élévation de température suit une courbe progressivement ascendante, puis descendante. Elle dure au total de 6 à 10 jours, puis les phénomènes dyspnéiques disparaissent et tout rentre dans l'ordre.

Il est remarquable d'observer que la fièvre et la toux sont



d'autant plus prolongées et plus violentes que la résistance des animaux est plus marquée (vaches 2, 3 et 5 de la première série).

Au contraire, chez la vache n° 6 qui fit une mammite tuberculeuse 8 mois après l'épreuve, la fièvre et les symptômes pulmonaires ne durèrent que 4 jours.

Nous avons d'abord pensé que cette réaction fébrile des bovidés supposés vaccinés n'était autre chose qu'une réaction tuberculinique analogue à celle que l'on obtient en injectant une forte dose de tuberculine, ou des bacilles morts, dans les veines d'un animal tuberculeux. Mais nous avons dû nous convaincre que cette interprétation n'est pas exacte, car nous avons injecté jusqu'à 0<sup>gr</sup>,50 de tuberculine pure (précipitée par l'alcool) dans les veines d'autres bovidés vaccinés comme les précédents par les voies digestives, sans observer chez eux la moindre élévation de température.

Il s'agit donc bien ici d'une réaction spéciale à l'organisme d'animaux qui ont acquis un certain degré d'immunité et sont devenus capables d'empêcher les bacilles introduits dans leur circulation sanguine de créer dans leurs tissus des lésions tuberculeuses.

#### RÉSISTANCE DES ANIMAUX TUBERCULEUX OU TUBERCULINÉS AUX RÉINFECTIONS TUBERCULEUSES

*Robert Koch* a observé le premier que, lorsqu'on inocule une petite quantité d'émulsion de bacilles tuberculeux vivants sous la peau d'un cobaye déjà tuberculeux, cette seconde inoculation produit un abcès local qui ne tarde pas à se vider et l'ulcération qui lui succède guérit, tandis que la première inoculation continue à produire ses effets, quoique avec plus de lenteur. Cette importante constatation a servi de point de départ à ses travaux sur la *tuberculine*.

Au cours de nos expériences sur les bovidés, notre attention a été attirée sur des phénomènes analogues :

Nous avons vu que lorsqu'on inocule par voie intraveineuse 5 milligrammes de bacilles virulents d'origine bovine à une vache saine, celle-ci prend une tuberculose suraiguë à forme granulique, mortelle en 4 à 6 semaines.

Par contre, si la même inoculation est faite, également par voie veineuse, à un bovidé réagissant à la tuberculine, jamais on ne voit apparaître chez lui de symptômes graves : il réagit

presque immédiatement, comme s'il avait reçu une injection de tuberculine puis, vingt-quatre heures après, sa température redevient normale et la tuberculose évolue chez lui sous forme *chronique*.

Il en est exactement de même si, au lieu de réaliser cette expérience sur des vaches tuberculeuses, on *prépare* des animaux *neufs* en leur injectant préalablement, à 6 ou 10 jours d'intervalle, deux ou trois grosses doses de tuberculine (0 gr. 50 de tuberculine précipitée par l'alcool) dans les veines. Les animaux ainsi *préparés* réagissent à la seconde (jamais à la première) ou à la troisième injection de tuberculine, *comme s'ils étaient tuberculeux*. La réaction, toujours très forte (2°,3 à 2°,7) apparaît chez eux dès la 5<sup>e</sup> heure et disparaît à la 12<sup>e</sup>. Si, quelques jours après la dernière injection tuberculinique, on leur injecte dans les veines 5 milligrammes de bacilles bovins virulents, en même temps qu'à des témoins non imprégnés de tuberculine, on constate que ces derniers ne font aucune réaction immédiate, mais présentent, douze à quinze jours plus tard, tous les signes d'une tuberculose suraiguë granulique, tandis que, chez tous les autres, l'introduction des bacilles est presque immédiatement suivie d'une forte fièvre qui dure 5 à 7 jours et rétrocede en même temps que s'installent chez eux des lésions de tuberculose à évolution lente.

Nous avons abattu, 60 jours après l'inoculation intraveineuse de 5 milligrammes de bacilles, trois vaches dont *deux* avaient été achetées *réagissant à la tuberculine* et *une* avait été *préparée par trois injections de tuberculine*, comme il est dit ci-dessus.

Chez les deux premières, en dehors de vieilles lésions tuberculeuses siégeant dans les ganglions mésentériques et médiastinaux, nous avons trouvé les poumons farcis de petits tubercules très fins dont quelques-uns atteignaient la grosseur d'un grain de chènevis; la plupart étaient encore translucides; les plus gros déjà caséux au centre. C'étaient évidemment des lésions récentes produites par l'injection intraveineuse de bacilles.

Chez la troisième (préparée par la tuberculine), il n'y avait que des lésions pulmonaires absolument semblables aux précédentes, sans hépatisation des tissus environnant les tubercules.

Il est donc hors de doute que *les animaux tuberculeux, et*



*aussi les animaux sains préparés par des injections massives de tuberculine, sont incomparablement plus résistants que les animaux neufs à l'inoculation intraveineuse d'épreuve.*

On peut supposer que les bovidés injectés par voie sous-cutanée avec des bacilles bovins ou humains (*Lignières*), ou sous la peau desquels on introduit des sacs de roseau colloïdionné contenant des cultures de tuberculose (*Heymans*), acquièrent, par un mécanisme identique, une résistance marquée à l'infection tuberculeuse : les bovidés ainsi préparés gardent plus ou moins longtemps les apparences d'une bonne santé ; ils perdent fréquemment l'aptitude à réagir à la tuberculine, mais ils n'en restent pas moins *porteurs de bacilles* (libres ou encapsulés) et *susceptibles de contracter une tuberculose à forme chronique*. On ne saurait donc admettre qu'il s'agit là d'une véritable *immunité*.

De multiples expériences nous ont montré qu'on observe des phénomènes semblables chez les bovidés artificiellement ou spontanément tuberculisés par les voies digestives, lorsqu'on vient à leur inoculer ultérieurement une culture de tuberculose *sous la peau*. Il se forme alors un abcès au niveau du point d'inoculation, mais les ganglions voisins ne se prennent pas et l'abcès guérit lorsqu'il s'est vidé à l'extérieur.

On constate fréquemment des faits analogues en clinique humaine. Chacun sait qu'une tuberculose locale suppurée, survenant chez un tuberculeux pulmonaire, améliore l'état du malade et accroît considérablement sa résistance. Inversement, il est rare que les sujets chez lesquels la tuberculose pulmonaire évolue avec une marche rapide aient été atteints antérieurement de suppurations ganglionnaires, osseuses ou cutanées, hormis les cas où une opération chirurgicale inopportune a pu provoquer une infection sanguine. C'est une notion courante, à l'Hôpital Saint-Louis, qu'un quart environ des lupiques présentent des signes d'auscultation caractéristiques de la tuberculose pulmonaire et que celle-ci évolue généralement chez eux avec une très grande lenteur ; aussi, beaucoup de lupiques deviennent-ils très vieux.

Si l'on veut bien se rappeler que certains cliniciens ont prétendu obtenir, chez les malades phthisiques, de réelles améliorations à la suite d'inoculations sous-cutanées de cultures de

tuberculose bovine virulente (*F. Klemperer*) ou de bacilles morts (*Maragliano*), ou de cultures de tuberculose humaine modifiée par passages dans l'organisme d'animaux à sang froid (crocodile) (*Moeller*), les faits expérimentaux qui précèdent sont de nature à justifier dans une certaine mesure leurs assertions.

Mais une telle méthode thérapeutique est assurément condamnable. Elle l'est d'autant plus que nous possédons dans la tuberculine un moyen aussi efficace et moins dangereux permettant d'atteindre le même but.



### CONCLUSIONS

1° Par l'ingestion de bacilles tuberculeux virulents ou modifiés par le chauffage, on peut conférer aux bovidés jeunes ou adultes une *immunité relative*. Lorsqu'on éprouve ultérieurement la résistance des animaux ainsi préparés, en leur faisant ingérer une dose massive de bacilles virulents sûrement capable d'infecter les témoins, on constate qu'au bout de 4 à 6 mois ils restent indemnes, qu'ils ne réagissent pas à la tuberculine et que leurs ganglions mésentériques, médiastinaux, bronchiques et rétropharyngiens ne recèlent plus de bacilles tuberculeux : l'inoculation de ces ganglions au cobaye reste inoffensive. Mais aucune expérience d'assez longue durée ne permet encore d'affirmer que ces animaux soient capables de résister au delà d'une année aux infections artificielles par voie digestive ou à l'infection naturelle par cohabitation ;

2° Par contre, lorsque 8 mois ou 1 an après avoir résisté à une infection massive par les voies digestives, des bovidés supposés ainsi vaccinés reçoivent, *en injection intraveineuse*, une dose de bacilles tuberculeux virulents suffisante pour tuer les témoins en 4 à 5 semaines par granulie aiguë, on trouve que les vaccinés, après une courte période de malaise, gardent pendant 6 à 8 mois toutes les apparences d'une santé parfaite. Ils *conservent* néanmoins, *dans leurs ganglions bronchiques et médiastinaux, des bacilles virulents capables de tuberculiser les cobayes*. Ces bacilles ne manifestent aucunement leur présence, pas même par la réaction positive à la tuberculine.

Mais lorsque, après un délai variable de 6 à 8 mois environ,



l'immunité de l'animal disparaît, ces bacilles deviennent susceptibles de créer des lésions tuberculeuses ;

3° Les bacilles tuberculeux de culture, introduits par les voies digestives, finissent donc, après un temps plus ou moins long, par se résorber dans les ganglions mésentériques lorsqu'ils n'y sont pas en nombre suffisant pour y créer des lésions, tandis qu'introduits par voie intraveineuse ils restent vivants et virulents dans les groupes ganglionnaires qui desservent les organes thoraciques ;

4° Les animaux tuberculeux ou sensibilisés à la tuberculine par deux ou trois injections massives de cette substance dans les veines présentent une résistance très grande aux réinfections ou aux infections tuberculeuses graves, naturelles ou artificielles, alors même que celles-ci sont réalisées par voie intraveineuse.

Cette résistance, quoique moindre, paraît être de même nature que celle que confèrent les vaccinations soit par inoculation intraveineuse de bacilles humains ou bovins (*Behring, Koch et Schütz*) ou homogènes (*Arloing*), soit par inoculation sous-cutanée de ces mêmes bacilles (*Lignières, Arloing*), soit par insertion sous la peau de sacs en roseau collodionné contenant des cultures de tuberculose bovine ou humaine (*Heymans*).

Il ne s'agit là en aucune manière d'une immunité vraie, puisque les animaux ainsi vaccinés, bien qu'insensibles à la réaction tuberculinique, restent porteurs de bacilles vivants et virulents et que ceux-ci sont capables, lorsque la résistance vient à fléchir, de créer dans l'organisme de ces mêmes animaux des lésions graves <sup>1</sup>, et puisque, d'autre part, ainsi que *Roux et Vallée* l'ont démontré, la vaccination par voie veineuse ou sous-cutanée ne protège pas contre l'infection intestinale.

Les faits que nous avons expérimentalement étudiés confirment les observations des cliniciens qui attestent la rareté des tuberculoses pulmonaires à marche rapide chez les sujets antérieurement atteints de tuberculoses locales suppurées ou de tuberculoses ganglionnaires en apparence guéries.

1. Dans l'expérience de *Melun* (1906), chez les animaux vaccinés avec le bovo-vaccin de *Behring*, les bacilles de l'inoculation d'épreuve n'avaient pas encore été résorbés après six mois (*Vallée et Rossignol, Moussu*).

# L'Aldéhyde acétique dans le vin : son origine et ses effets.

PAR M. A. TRILLAT  
(Avec les pl. VIII et IX.)

## PREMIÈRE PARTIE

Formation des dépôts et mécanisme de la fixation de résidu aldéhydique à la matière colorante du vin.

### HISTORIQUE

La présence de dérivés aldéhydiques dans les vins a été observée pour la première fois par Doebereiner en 1821 : l'identification de l'aldéhyde acétique ne semble avoir été faite que plus tard par Liebig, en 1835<sup>1</sup>. Ce produit fut ensuite signalé dans le vin par Chancel, puis par Mayne-Lahens<sup>2</sup> qui le trouva aussi dans le vinaigre.

Maumené<sup>3</sup> a maintes fois constaté cette présence d'aldéhyde. Dans son ouvrage sur les maladies du vin, Pasteur<sup>4</sup> admet aussi l'existence d'aldéhyde acétique. Berthelot<sup>5</sup> fait mention de composés aldéhydiques dérivés d'alcools polyatomiques formés au cours de l'oxydation du vin et des boissons fermentées. Depuis ces observations, un grand nombre d'auteurs ont reconnu que l'aldéhyde acétique existait dans les vins, le vinaigre, les eaux-de-vie et les liqueurs ; son dosage est devenu d'une pratique courante dans les laboratoires.

On voit par cette courte bibliographie que la notion de l'existence de l'aldéhyde acétique dans les vins et eaux-de-vie est connue depuis longtemps.

Mais l'attention des œnologues n'a guère été fixée sur le rôle joué par cette aldéhyde, au cours des diverses modifications subies par le vin. Berthelot fut un des premiers qui le fit entrevoir dans sa théorie sur la formation du bouquet au cours du vieillissement. Il fut un peu mieux précisé à la suite d'expériences qui mirent en évidence l'action énergique de l'aldéhyde acétique sur les

1. *Journal de Pharmacie et de Chimie*, t. IX, p. 513.

2. *Journal de Pharmacie et de Chimie*, t. XXVII, p. 37.

3. *Traité du Travail des vins*, 1874.

4. *Etude sur le vin*, 1866.

5. *C. R. de l'Ac. des Sc.*, 1867, p. 983.



matières colorantes du vin rouge. On sait que cette matière colorante du vin est constituée par une substance très oxydable à l'air et les travaux de Pasteur<sup>1</sup> ont démontré que l'abondance des dépôts dans le vin soutiré, indépendamment des dépôts microbiens, était liée de la manière la plus directe avec une absorption d'oxygène. Rappelons que les expériences de Pasteur ont consisté à prouver que le vin rouge, à l'abri de l'air, pouvait se conserver indéfiniment, sans formation de dépôt.

Mais cette absorption d'oxygène ayant toujours eu pour effet d'aldéhydifier plus ou moins en même temps l'alcool vinique, on pouvait se demander si ces dépôts, pour une partie, ne provenaient pas de la combinaison de la matière colorante avec l'aldéhyde acétique comme on le verra plus loin.

On sait, en effet, par de nombreuses expériences, que l'aldéhyde acétique se forme facilement dans le vin sous l'influence du soutirage, d'une exposition, ou d'une agitation à l'air, ou bien au cours de son vieillissement ou des maladies, c'est-à-dire dans des circonstances qui accompagnent généralement la précipitation du dépôt.

\*  
\* \*

L'action des aldéhydes sur les vins rouges fut signalée par moi pour la première fois en 1891<sup>2</sup>. Comme démonstration j'indiquais qu'une dose de 1/4000 de formaldéhyde précipitait la matière colorante des vins rouges avec laquelle elle formait une laque insoluble.

A la suite de ces observations, M. Jablin-Gonnet entreprit, sur mes conseils, une série d'essais dans le but d'utiliser cette réaction pour la recherche des matières colorantes étrangères du vin<sup>3</sup>.

Plus récemment, M. Ferdinand Jean a appliqué cette méthode au dosage, non seulement de la matière colorante du vin rouge, mais en général à celui des matières colorantes d'origine végétale<sup>4</sup>.

En 1898, M. Martinand<sup>5</sup> a trouvé que d'autres aldéhydes

1. *Etude sur le vin*, p. 117.

2. *C. R. Acad. des Sc.*, août 1891. *Journ. de Pharm. et de Chimie*, 1892, p. 341.

3. *Journ. de Pharm. et de Chim.* 1892, p. 453.

4. *Ann. de Chimie analytique*, 1906.

5. *Revue de Viticulture*, t. IX, p. 306.

telles que l'aldéhyde acétique et les autres aldéhydes de la série grasse et même de la série aromatique, provoquaient les mêmes précipitations de la matière colorante du vin rouge que la formaldéhyde; il fit la remarque que les vins rouges se cassaient par une légère addition d'aldéhyde acétique, comme je l'avais observé pour l'aldéhyde formique. Il émit l'hypothèse que la présence de l'aldéhyde acétique pouvait bien ne pas être étrangère à la formation des dépôts. Dans la fermentation normale, d'après cet auteur, il ne se produit pas assez d'aldéhyde pour décolorer le vin, mais il s'en formerait toujours assez pour provoquer un dépôt de matière colorante.

Enfin, M. Pottevin, à la suite de plusieurs expériences, exprimait aussi l'opinion qu'il pouvait bien y avoir une relation de cause à effet entre le dépôt qui se forme au cours de la casse du vin et l'augmentation en aldéhyde produite pendant la maladie.

Au moment où j'ai entrepris cette étude on connaissait donc déjà, à la suite de mes propres observations et de celles de Martinand et de Pottevin postérieures aux miennes, l'action des aldéhydes sur la matière colorante du vin rouge.

Etant données les propriétés de l'aldéhyde acétique de s'acétifier à l'air, de se combiner avec les alcools pour former des acétals, de se résinifier sous diverses influences, on pouvait se demander aussi si son rôle se bornait uniquement à insolubiliser les matières colorantes et ne se manifestait pas encore, notamment dans la production du bouquet.

D'autre part, la formation de l'aldéhyde acétique dans le vin dépend, nous le verrons plus loin, d'une foule de circonstances qui influent non seulement sur ses proportions, mais sur l'ordre et la marche de ces combinaisons.



J'ai donc cru combler une lacune en étudiant d'une façon plus précise ce rôle prévu, mais encore mal défini, de l'aldéhyde acétique, en établissant par de nombreuses expériences la part qu'on peut définitivement lui attribuer dans les modifications du vin, telles que la précipitation, le vieillissement et les altérations.

*Division.*—Après avoir établi le choix d'une méthode de dosage de l'aldéhyde acétique, j'étudierai, dans la *première partie* de ce



travail, l'action générale de l'aldéhyde sur le vin ; l'analogie existant entre les dépôts normaux et les dépôts provoqués par aldéhydification artificielle ; leur composition chimique et le mode de formation de ces dépôts.

Dans la *deuxième partie*, j'examinerai l'origine de l'aldéhyde acétique dans les vins et les influences qui font varier ses proportions, telles que l'aération, l'agitation, la température, la composition du vin, les altérations, etc.

La *troisième partie* sera consacrée à l'étude du rôle de l'aldéhyde au cours des modifications du vin, comme le vieillissement et les maladies.

### Choix d'une méthode pour le dosage de l'aldéhyde acétique.

Le dosage de l'aldéhyde étant une des bases de ce travail, j'ai porté toute mon attention sur le choix d'une bonne méthode. Les erreurs que l'on peut commettre dans ce dosage sont si nombreuses que je crois indispensable de décrire le mode opératoire que j'ai adopté au cours des essais. Des exemples récents<sup>1</sup> prouvent en effet que des chimistes expérimentés peuvent, pour le même cas, obtenir des chiffres variant du simple au quintuple. J'estime donc que mes observations pourront être de quelque utilité.

Les trois procédés les plus recommandables sont les suivants : 1<sup>o</sup> procédé au bisulfite de rosaniline ; 2<sup>o</sup> procédé au chlorhydrate de métaphénylène-diamine ; 3<sup>o</sup> procédé au phénol de MM. Barbet et Jeandrier.

Le premier est utilisé surtout en France ; le deuxième l'est plus spécialement en Suisse et en Allemagne ; l'usage du troisième est plus limité<sup>2</sup>.

Toutes ces méthodes reposent sur des évaluations colorimétriques ; les deux premières notamment donnent lieu à des critiques diverses qui peuvent se résumer ainsi :

1<sup>o</sup> Les colorations sont communes à toutes les aldéhydes de la série grasse et de la série aromatique et à la plupart de leurs dérivés comme les acétals ;

2<sup>o</sup> Pour une même aldéhyde, il n'existe aucune proportion-

1. *Moniteur scientifique*, 1907 : Sur la question des eaux-de-vie et alcools, par M. Gardrat.

2. *Bullet. de l'Assoc. des Chimistes de sucrerie*, 1906, p. 251.

nalité entre le temps d'apparition de la coloration, son intensité et la teneur en aldéhyde;

3° Dans les comparaisons colorimétriques avec des types préparés à l'avance, les évaluations sont inexactes si ces types et les distillats à essayer n'ont pas exactement le même degré alcoolique : par exemple, si on dose l'aldéhyde dans un distillat à 5 degrés d'alcool avec un type de comparaison d'un degré différent, les indications seront défectueuses au point de donner des écarts considérables;

4° Les procédés en usage ne tiennent pas compte de l'aldéhyde provenant de l'oxydation de l'alcool au cours du dosage.

Pour diminuer dans la limite du possible ces causes d'erreurs, j'ai opéré de la manière suivante :

Après avoir expérimenté la valeur comparative de ces méthodes, j'ai adopté la plus ancienne, celle au bisulfite de rosaniline avec la formule donnée par M. Gayon.

Les distillations pour les dosages les plus délicats étaient effectués sur 100 c. c. de liquide, dans des ballons de 200 c. c. de capacité, dans lesquels on faisait passer un courant d'acide carbonique. Le distillat, soit 50 c. c., était ramené à son volume primitif, on en prenait le titre alcoolique et la comparaison colorimétrique avait lieu avec des types de même degré. Une première comparaison indiquait tout d'abord la richesse approximative en aldéhyde. On procédait ensuite à une deuxième évaluation définitive avec des types plus voisins.

La préparation de ces solutions types d'aldéhyde exige de grands soins. J'ai rejeté, pour la confection des types, l'emploi préconisé de l'aldéhydate d'ammoniaque : la solution s'altérant très vite, il est préférable d'aspirer dans une ampoule tarée de l'aldéhyde acétique pure refroidie par un mélange réfrigérant ; l'ampoule est brisée dans le liquide alcoolique qui est ramené ensuite par dilution au titre voulu. Les comparaisons doivent se faire à la même température; la distillation dans le même temps et dans les mêmes appareils.

Sans l'observation rigoureuse de ces précautions, on risque fort d'avoir des résultats inexacts.

*Dosage de l'aldéhyde totale.* — La distillation du vin et de l'eau-de-vie, telle qu'on la pratique dans la méthode courante,



donne bien toute l'aldéhyde libre, mais elle ne fournit qu'une partie de l'aldéhyde combinée aux divers éléments du vin : alcool, matière colorante, acide sulfureux, etc.

En ajoutant des doses connues d'aldéhyde acétique à du vin rouge, on ne retrouve pas la totalité de l'aldéhyde introduite. Les acides organiques du vin ne décomposent donc que partiellement ces combinaisons.

Si, au moment de la distillation, on ajoute au vin ou à l'eau-de-vie une petite quantité d'acide minéral comme l'acide phosphorique, on trouve généralement<sup>1</sup> un excès d'aldéhyde acétique qui atteint parfois le tiers de la quantité trouvée dans la distillation simple.

C'est ce que met en évidence le tableau suivant :

TABLEAU I

	DOSAGE SANS ACIDE aldéhyde en millig. 0/00.	DOSAGE en présence d'acide phosphorique.
Vin rouge Aramont 1906.....	45	55
Vin rouge Aramont 1905.....	35	45
Bordeaux (vieux).....	35	67
Bourgogne (vieux) <sup>1</sup> .....	90	115
Vin blanc (vieux).....	45	48
Eau-de-vie (1895).....	364	407
Eau-de-vie (1896).....	362	561
Xérès (15 ans).....	276	418

Comme on le voit, les différences sont loin d'être négligeables et les chiffres d'aldéhyde totale donnés jusqu'à ce jour par les auteurs risquent fort d'être inexacts.

Dans les dépôts de vin en suspension dans l'eau, la distillation pratiquée en milieu neutre ou en milieu tartrique ne donne pas trace d'aldéhyde : par addition d'une petite quantité d'acide phosphorique, on régénère l'aldéhyde combinée.

1. Je dois cependant signaler que certains vins ou eaux-de-vie n'ont donné qu'une très légère différence : dans 2 cas, je ne l'ai même pas observée. Dans ces exemples, la simple distillation a suffi pour extraire toute l'aldéhyde récupérable.

Il résulte de ces expériences qu'il y aura lieu de modifier la méthode habituelle quand on voudra se rapprocher de la quantité théorique d'aldéhyde combinée aux éléments du vin. Dans ce cas, il suffit d'ajouter au vin ou aux liquides à distiller 3 à 4 c. c. pour 100 d'acide phosphorique officinal. Lorsqu'il s'agit d'évaluer l'aldéhyde dans les dépôts, on opère sur 2 grammes que l'on délaie dans 100 c. c. d'eau additionnée de 3 c. c. d'acide phosphorique.

## I

## FORMATION DE DÉPÔTS SOUS L'INFLUENCE DE L'ALDÉHYDIFICATION DU VIN

Le rôle de l'aldéhyde acétique dans la formation des dépôts de vin ressort des considérations suivantes que j'examinerai successivement :

1<sup>o</sup> Les aldéhydes de la série grasse et les acétals ont une grande affinité chimique pour la matière colorante du vin rouge et provoquent, à faibles doses, la formation de précipités ;

2<sup>o</sup> Les dépôts peuvent être obtenus à l'abri de toute intervention de l'air, si le vin se trouve préalablement aldéhydifié ou additionné d'acétal éthylique ;

3<sup>o</sup> Ils présentent à l'examen microscopique les mêmes particularités que les dépôts normaux ;

4<sup>o</sup> Les dépôts de vins peuvent par distillation régénérer une petite quantité d'aldéhyde acétique.

§ I. *Action de l'aldéhyde acétique sur le vin.*

J'ai étudié directement l'action de l'aldéhyde acétique sur un grand nombre de vins rouges de provenances variées et dont on connaissait l'âge et la composition. Ils étaient additionnés, en séries, de doses croissantes d'aldéhyde acétique ; on notait l'apparition du dépôt dans chacun d'eux, comparativement à des témoins.

Le tableau suivant indique tout d'abord que la rapidité de la précipitation de la matière colorante du vin rouge croît avec la dose d'aldéhyde.



TABLEAU II

DILUTION de l'aldéhyde dans le vin.	OBSERVATIONS APRÈS							
	12 h.	24 h.	48 h.	3 jours.	8 jours.	15 jours.	30 jours.	90 jours.
1/500	Trouble.	Dépôt.						
1/1000	Trouble.	Dépôt.						
1/2000	Clair.	Clair.	Trouble.	Dépôt.				
1/5000	Clair.	Clair.	Clair.	Clair.	Dépôt.			
1/10000	Clair.	Clair.	Clair.	Clair.	Clair.	Trouble.	Dépôt.	
1/20000	Clair.	Clair.	Clair.	Clair.	Clair.	Clair.	Dépôt.	Dépôt.
1/40000	Clair.	Clair.	Clair.	Clair.	Clair.	Clair.	Léger dépôt.	?
1/50000	Clair.	Clair.	Clair.	Clair.	Clair.	Clair.	Léger dépôt.	Dépôt.
Témoins.	Clair.	Clair.	Clair.	Clair.	Clair.	Clair.	Clair.	Léger dépôt.

Les mêmes phases de précipitation se reproduisent pour le même vin, mais si l'on fait varier l'origine du vin, les quantités d'aldéhyde nécessaires pour provoquer la précipitation ne sont plus les mêmes.

Les vins suivants, d'origines différentes, ont été additionnés de 1/5000 d'aldéhyde et ont donné lieu aux observations suivantes :

TABLEAU III

ORIGINE DU VIN	OBSERVATIONS après 8 jours.	OBSERVATIONS après 15 jours.	OBSERVATIONS après 1 mois.
Aramont (1906).....	Dépôt.		
Aramont (1907).....	Clair.	Clair.	Dépôt.
Beaujolais (1907).....	Dépôt.		
Vieux Beaujolais.....	Clair.	Clair.	Dépôt.
Vin d'Algérie (1902)....	Dépôt.		
Bordeaux (1898).....	Clair.	Clair.	Dépôt.
Vin de Savoie.....	Clair.	Dépôt.	

Dans les vins à faible degré alcoolique, comme les vins d'Aramont, la dose de 5 centigrammes par litre suffit pour provoquer la précipitation après 2 mois, et la dose de 10 cen-

tigrammes après 15 jours, les témoins restant indemnes de tout dépôt apparent.

Il résulte de ces expériences que la composition du vin, pour une dose déterminée d'aldéhyde acétique, a une grande influence sur la vitesse de l'apparition du dépôt.

A quoi tient cette différence ?

Evidemment à une plus ou moins grande solubilité du dépôt selon les circonstances. Pour le démontrer, j'ai fait varier pour un même vin le poids des éléments suivants : alcool, acidité, sucre et glycérine.

Le tableau IV indique ces variations, en même temps que les résultats correspondants obtenus.

TABLEAU IV

ÉLÉMENTS DE composition.	Vin.	Diminution du degré alcoolique.	Augmentation de la glycérine.	Diminution de l'acidité.	Augmentation du sucre.
Alcool.....	10°	2°	10°	10°	10°
Glycérine.....	7	7	15	7	7
Acidité.....	5	5	5	1	5
Sucre.....	2	2	2	2	10
Ces vins additionnés de 1/5000 d'aldéhyde acétique ont donné lieu aux observations suivantes :					
Apparition du dépôt après 8 j..	Néant.	Dépôt.	Néant.	Dépôt.	Néant.
Apparition du dépôt après 15 j.	Néant.		Néant.		Néant.

#### CONCLUSION

Le dépôt apparaît donc d'autant plus rapidement dans un vin que le degré alcoolique est moins élevé et qu'il est plus riche en sucre ou en glycérine.

Ces observations expliquent bien pourquoi un vin additionné d'aldéhyde est parfois très lent à précipiter. Ainsi des vins additionnés de 1/800 d'aldéhyde n'ont déposé qu'après 8 jours. Par contre, d'autres vins sont tellement sensibles à l'action de l'aldéhyde acétique qu'une dose de 1/80000 a suffi pour ame



ner un commencement de dépôt que ne présentaient pas les témoins après une période de 3 mois de contact (expérience faite sur des vins de coupage du Midi, titrant 7° et prélevés à Paris pendant les mois de juillet, août et septembre 1906).

On verra plus loin, à propos du rôle de l'aldéhyde acétique dans le vieillissement du vin, que les acétals, comme les aldéhydes dont ils dérivent, agissent sur la matière colorante du vin, avec laquelle ils forment à la longue les mêmes précipités dans les mêmes conditions.

### §. 2. *Formation de dépôts à l'abri de l'air.*

La précipitation de la matière colorante du vin peut être obtenue, contrairement à la notion qu'on en avait, en dehors de toute intervention de l'air, si le vin est aldéhydifié artificiellement au moment de l'expérience.

a) On a répété l'expérience de Pasteur en faisant le vide, sur des vins contenus dans des ampoules de verre, dans lesquelles on faisait pénétrer ultérieurement quelques milligrammes d'aldéhyde acétique. Il faut avoir soin, dans cette expérience, de bien purger le liquide de ses moindres traces d'air.

Témoins et essais déposent dans le même temps.

b) Pour être plus sûr qu'il n'y a pas de traces d'air retenues par le liquide, on a répété les essais en présence d'acide carbonique et d'hydrogène. A cet effet, les échantillons de vin étaient placés sous une cloche à vide, dans laquelle on faisait passer un grand nombre de fois de l'acide carbonique ou de l'hydrogène. Au moyen d'un dispositif spécial, on introduisait l'aldéhyde acétique dans le vin. Dans tous les cas, il y a eu dépôt de matière colorante.

c) On remplit aux deux tiers une série de tubes à essais avec un vin rouge et on fait couler sur le vin une couche d'huile de 2 à 3 centimètres d'épaisseur, ce qui est suffisant pour intercepter le contact avec l'air pendant plusieurs heures. Au moyen d'un tube très effilé on introduit dans l'intérieur de la couche de vin quelques gouttes d'aldéhyde acétique; le dépôt se produit de la même façon que dans les tubes témoins exposés à l'air.

d) La formation de dépôt d'origine aldéhydique dans le vin est encore démontrée par la régénération de petite quantité d'aldéhyde provenant d'un traitement approprié des dépôts.

Les dépôts provenant des lies ou des raclages des parois de bouteilles, après avoir été broyés, sont lavés à l'eau distillée jusqu'à disparition complète d'alcool et ensuite séchés au bain-marie. On pèse 2 grammes de ces dépôts secs que l'on place dans un ballon de 100 c. c., contenant 50 c. c. d'eau distillée, additionnée de 2 grammes d'acide phosphorique. On procède ensuite au dosage de l'aldéhyde suivant la méthode que j'ai indiquée.

Le tableau suivant exprime les résultats obtenus en dosant l'aldéhyde des dépôts de lies et de bouteilles.

TABLEAU V

NATURE DES DÉPÔTS	Aldéhyde exprimée en milligr. pour 1000 grammes de dépôt sec.
Lies de vin blanc provenant des entrepôts de Bercy.	134
Lies de vin rouge provenant des entrepôts de Bercy.	240
Dépôts de tonneau (vin rouge du Midi).....	180
Dépôts de bouteilles (vin de Savoie).....	170
Dépôts de vin de Bordeaux.....	60
Dépôts de vin de Bourgogne.....	230
Dépôts de vin du Rhin.....	120

Ces chiffres ne sont pas négligeables, étant donnée, comme je l'ai montré plus haut, l'influence exercée à la longue par des doses infinitésimales d'aldéhyde acétique sur la matière colorante du vin rouge et qui s'explique, comme on le verra plus loin, par la grande différence des poids moléculaires des substances en jeu. Des résultats semblables sont donnés par la plupart des dépôts de vin, surtout dans les dépôts de vins vieux : ils indiquent donc qu'une fraction au moins de ces dépôts est d'origine aldéhydique.

### § 3. *Examen microscopique.*

Les précipités que l'on obtient par l'aldéhydification artificielle du vin offrent la plus grande analogie avec les dépôts normaux. Ils sont caractérisés par des granulations régulièrement



sphériques, d'une couleur brun-rouge et formant des dépôts adhésifs aux parois des récipients; on distingue des feuilles translucides, sous forme de voile, renfermant des granulations et quelquefois des cristaux de tartre. La particularité, signalée par Pasteur, de la présence de granulations violettes dans les dépôts normaux, se rencontre souvent dans les dépôts artificiels.

Afin de rendre cette analogie plus frappante, j'ai comparé les dépôts artificiels de vin obtenus par l'addition d'une dose de  $1/5000$  d'aldéhyde acétique avec les dépôts que Pasteur décrit comme normaux et qui sont si bien représentés dans son ouvrage sur le vin.

Les figures 1, 2, 3, de la planche VIII sont des types de dépôts normaux de vins jeunes ou vieux, d'après Pasteur. Les figures 4, 5 et 6 de la même planche correspondent aux dépôts artificiels.

Dans les 2 cas on reconnaît les 3 états physiques bien différents des dépôts :

1° Granulations régulières, analogues à des cellules organisées, tant leur sphéricité est parfaite ;

2° Granulations en petits amas formant des couches adhésives d'un rouge brun ;

3° Feuilles translucides colorées en rouge brun plus ou moins foncé.

La planche IX représente d'une part (fig. 1) les particularités, signalées par Pasteur, de granulations diversement colorées et que l'on trouve dans les dépôts normaux. La figure 2 représente les mêmes particularités que l'on trouve dans le dépôt provoqué par l'addition d'aldéhyde dans un vin rouge, après 48 heures.

Ainsi donc, comme l'examen chimique, l'examen microscopique tend aussi à prouver qu'une partie plus ou moins importante des dépôts considérés comme normaux de vin est constituée par des dépôts d'origine aldéhydique, dépôts qui augmentent chaque fois qu'une circonstance favorisera le développement de l'aldéhyde dans le vin.

#### § 4. *Fixation du résidu aldéhydique à la matière colorante du vin.*

On peut se demander comment se fixe le résidu aldéhydique à la matière colorante du vin rouge qu'il insolubilise. Cela m'en-

traîne tout d'abord à donner quelques explications sur ce que l'on sait de la constitution de celle-ci.

La couleur du vin n'est pas due à une matière colorante unique. M. Armand Gautier a démontré qu'elle avait une composition différente selon le cépage. D'après lui, l'ensemble des matières colorantes retirées du vin formerait une famille naturelle de corps ayant une composition très analogue : ce sont des acides faibles, appartenant à la série aromatique par leurs propriétés et leur mode de dédoublement.

On connaît aujourd'hui plusieurs matières colorantes du vin. La première a été analysée en 1858 par Glenard<sup>1</sup>. M. A. Gautier a retiré des raisins de Carignan et de Grenache, cépages bien connus dans le midi, deux autres matières colorantes, répondant aux formules  $C^{21} H^{20} O^{10}$  et  $C^{23} H^{22} O^{10}$ . Le Pinot, le Teinturier, donnent des matières colorantes analogues, tandis que celles provenant de l'Aramont est fort différente<sup>2</sup>. En même temps, on rencontre dans les vins, en petite quantité, une matière colorante azotée qui, d'après les analyses de M. A. Gautier, serait un dérivé amidé : ce serait la plus facilement entraînable par le collage.

M. A. Gautier, en dédoublant ces matières colorantes, a montré qu'elles correspondaient à des acides tétratmiques, renfermant par conséquent plusieurs groupements hydroxylés. Cette constitution se trouve vérifiée par les propriétés tinctoriales de la matière colorante du vin<sup>3</sup>. Il a été en effet prouvé que les couleurs se fixant sur les fibres textiles renfermaient soit le groupement phénolique OH, soit le groupement amidogène AzH.

\*  
\* \*

La composition de la matière colorante du vin rouge, établie par M. A. Gautier, va me permettre d'expliquer le mécanisme de sa précipitation en présence d'une aldéhyde.

L'action précipitante des aldéhydes vis-à-vis des phénols et des composés à fonction amidogène a déjà été étudiée par plusieurs auteurs et j'ai publié moi-même des observations sur cette question<sup>4</sup>.

1. *Ann. de Phys. et Ch.*, LIV, p. 66.

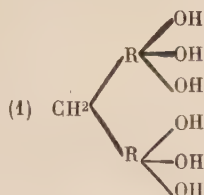
2. *C. R. Acad. des Sc.*, juin 1878.

3. *Recherches nouvelles sur les vins*, thèse, Lyon, 1891.

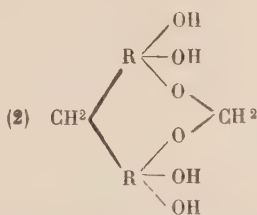
4. WURTZ, *Dict. de Chimie; Fascicule* : Article Phénols.



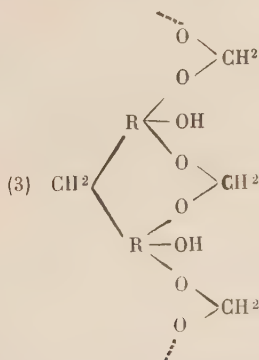
Quand on met en présence une aldéhyde énergique, comme l'aldéhyde formique que je vais prendre comme exemple, avec un phénol ou un polyphénol, il y a soudure du résidu méthylénique par les noyaux aromatiques avec élimination d'eau, on obtient des corps cristallisés et bien définis possédant, la constitution suivante (R étant un noyau aromatique) fig. 1 :



Mais l'aldéhyde peut encore réagir sur les hydroxyles. C'est le cas le plus général pour les polyphénols : on obtient des précipités amorphes *d'autant moins solubles que le nombre d'hydroxyles soudés est plus grand* (fig. 2).



Cette soudure facilite la réunion de plusieurs molécules (fig. 3).



Avec les composés aromatiques amidés ou imidés, le phénomène est le même et je crois en avoir fait la démonstration en

étudiant l'action de l'aldéhyde sur la leukaniline et certaines matières colorantes du triphénylméthane<sup>1</sup>.

Une solution de rosaniline se comporte exactement comme la matière colorante du vin rouge. Il y a décoloration, virage de la couleur et précipitation sous forme de dépôt amorphe granulé plus ou moins soluble, selon que l'action de l'aldéhyde est plus prolongée, c'est-à-dire selon que le nombre de résidus aldéhydiques soudés est plus grand.

Les analyses suivantes que j'ai faites antérieurement d'une leukaniline aldéhydifiée ne laissent en effet aucun doute sur la fixation de résidus méthyléniques, démontrée par l'augmentation de poids du carbone et de l'hydrogène.

	Leukaniline			Leukaniline transformée.
	C <sup>10</sup>	H <sup>19</sup>	Az <sup>3</sup>	
Carbone.....	78,89			79,89
Hydrogène.....	6,57			6,72
Azote.....	14,53			13,45

D'après l'analogie et d'après ce que nous savons sur la question, l'aldéhyde acétique doit se comporter de la même façon que l'aldéhyde formique. Les essais suivants viennent encore à l'appui de cette hypothèse.

La combinaison entre l'aldéhyde acétique et la matière colorante du vin rouge n'exige qu'une très petite quantité d'aldéhyde, étant donnée la différence de leurs poids moléculaires. Mais cette différence, d'après le mécanisme que je viens d'expliquer, doit se manifester par une augmentation légère mais constatable du poids de la matière colorante précipitée. C'est ce que j'ai vérifié en comparant l'extrait d'un vin rouge aldéhydifié en excès. (J'indique plus loin les précautions à prendre pour la réussite de ces essais.)

<sup>1</sup> C. R. 1893, I, p. 1332; *Bull. de la Soc. chim.*, 1893, p. 565 et 610.

TABLEAU VI

POIDS DES EXTRAITS TÉMOINS pour un même vin.		POIDS DES EXTRAITS après aldéhydification.
1	25,154	25,200
2	25,160	25,210
3	25,160	25,212
4	25,155	25,205

Les différences, quoique dans le même sens, sont faibles.

J'ai répété le même essai sur du vin rouge concentré au  $\frac{1}{3}$ . Les différences ont été plus nettes.

TABLEAU VII

POIDS DES EXTRAITS TÉMOINS	POIDS DES EXTRAITS après aldéhydification.
74,622	75,630
74,624	75,630
74,624	75,628
74,625	75,632

L'hypothèse que je viens d'émettre au sujet de la fixation du résidu aldéhydique à la matière colorante du vin n'est donc pas purement d'ordre théorique : elle s'appuie sur des expériences et des analogies et cadre bien d'ailleurs avec toutes nos connaissances sur les propriétés des aldéhydes et des polyphénols. Elle explique notamment l'insolubilité variable et plus ou moins grande des dépôts d'origine aldéhydique.



#### EXPLICATION DES PLANCHES VIII ET IX

Pl. VIII. — Fig. 1, 2, 3. Dépôts normaux d'après Pasteur. — Fig. 4, 5, 6. Dépôts provoqués par aldéhydification.

Pl. IX. — Fig. 1. Coloration des granulations des dépôts d'un vin rouge aldéhydifié. — Fig. 2. Coloration des granulations des dépôts normaux, d'après Pasteur.



# LE ZINC CHEZ LES PLANTES

Recherches sur sa présence et son rôle

PAR MAURICE JAVILLIER

(Travail du laboratoire de M. G. BERTRAND)

---

L'analyse élémentaire des plantes montre que treize éléments chimiques interviennent de façon constante dans leur composition. Ces éléments C, H, O, N, P, S, Cl, Si, K, Na, Ca, Mg, Fl, ont dans la vie végétale une importance que leur abondance même permettait de prévoir. Les recherches physiologiques, poursuivies depuis un demi-siècle, ont précisé le rôle de ces éléments; elles ont eu pour conséquence pratique l'utilisation raisonnée, en agriculture, des engrais minéraux.

Mais, en appliquant des techniques analytiques très sensibles, les chimistes ont trouvé chez les plantes d'autres éléments chimiques : l'iode, le bore, l'arsenic, l'aluminium, le manganèse, le cuivre et beaucoup d'autres, si bien qu'aujourd'hui le nombre des éléments signalés chez les végétaux dépasse trente. La liste de ces éléments est d'ailleurs loin d'être close; de nouveaux perfectionnements apportés aux méthodes d'analyse l'étendront sans nul doute.

On se trouve dès lors conduit à se demander quel intérêt physiologique présentent des corps que l'on rencontre seulement à l'état de traces. Si l'on devait mesurer l'importance biologique d'un élément à sa masse dans l'être vivant, celle des éléments en question serait assurément bien petite ou nulle. Mais tel n'est point le cas. Tout un ensemble d'observations a montré que, dans les réactions de la chimie physiologique comme dans celles de la chimie générale, des doses infinitésimales de certains éléments peuvent intervenir à titre d'agents catalytiques. C'est le cas du manganèse dans les phénomènes d'oxydation par la laccase; c'est celui du calcium dans certains phénomènes de coagulation et de protéolyse, etc. Si la découverte des « infiniment petits organisés » a jeté la lumière sur la nature des fermentations et l'origine des

maladies infectieuses, l'intervention des « infiniment petits chimiques » explique à son tour un grand nombre de phénomènes biologiques. Il reste de ce côté un champ curieux à explorer.

\*  
\* \* \*

Guidé par ces idées générales, j'ai commencé l'étude du zinc dans les plantes. Ce métal avait été caractérisé à l'état de traces dans quelques végétaux <sup>1</sup> et trouvé en proportions souvent élevées dans les plantes dites « calaminaires » <sup>2</sup> que l'on rencontre abondamment sur les sols riches en minerais de zinc (Haute-Silésie, Vieille-Montagne, etc.). Mais il n'existait à ce sujet aucun travail d'ensemble et, dans plusieurs cas, l'absence de détails sur la technique expérimentale jetait quelque incertitude sur la valeur des résultats publiés.

J'ai pu aborder la question grâce à la technique nouvelle de précipitation et de dosage du zinc que nous avons étudiée. M. G. Bertrand et moi <sup>3</sup>. Je me borne à rappeler ici que la méthode repose, en principe, sur ce fait que le zinc donne avec la chaux une combinaison (zincate de calcium) extrêmement insoluble, se précipitant à l'état microcristallin lorsqu'on élimine par ébullition l'ammoniaque de ses solutions ammoniacales. Pour l'application de cette méthode à la recherche biologique du zinc, je renvoie au mémoire plus étendu que j'ai publié sur cette question <sup>4</sup>. On y trouvera exposé le détail des manipulations avec l'ensemble de précautions qui mettent l'opérateur à l'abri de toute cause d'erreur, et donnent à la méthode toute son exactitude.

J'ai recherché et dosé le zinc dans des plantes provenant de terrains différents par leur origine géologique et leur composition chimique. La majorité d'entre elles provenait pourtant de terrain primitif à roches granitoïde ou trachitique.

Voici, résumés en un tableau, quelques résultats expérimentaux.

1. Notamment dans *Fucus vesiculosus* et *Zostera maritima*, par FORSTAMMER, dans le blé, le maïs, l'orge... par LECHARTIER et BELLANY dans les bois de pin, d'épicéa, de vigne, de chêne... par DEMARCAY.

2. On réserve généralement ce nom aux espèces suivantes : *Viola lutea* Sm. var. *calaminaria*, *Thlaspi alpestre*, var. *calaminare* Lej., *Armeria maritima* Willd., var. *elongata*, *Alsine verna* Bartl. Pour toutes les indications bibliographiques et les détails techniques, consulter Javillier : « Recherches sur la présence et le rôle du zinc chez les plantes, » *Thèse Doct. Sc. nat.* Paris, 1908.

3. *C. R. de l'Acad. des Sc.*, t. CXLIII, p. 900 (1906), *Ibid.*, t. CXLV, p. 924 (1907).

4. *Thèse citée.*

FAMILLES	ESPÈCES végétales.	PARTIES employées.	ORIGINE géographique.	ZINC 0/0 de cendres.	ZINC 0/0 de mat. sèche.
				gr.	gr.
Conifères.	<i>Abies pectinata</i> D. C.	Tige jeune.	Lormes (Morvan).	0,150	0,0023
—	—	Feuilles.	—	0,070	0,0033
—	<i>Pinus strobus</i> L.	—	—	0,103	0,0030
—	<i>Larix europæa</i> D. C.	Rameaux av. feuilles.	—	0,040	0,0047
—	<i>Juniperus communis</i> L.	—	—	0,048	0,0029
Graminées.	<i>Agropyrum repens</i> P. B.	Rhizôme.	—	—	non caract.
—	<i>Triticum sativum</i> L.	Fruits.	—	—	caractérisé.
—	<i>Avena sativa</i> L.	—	—	—	caractérisé.
Bétulacées.	<i>Betula alba</i> L.	Ecorce.	ormes.	0,120	0,0135
—	<i>Alnus glutinosa</i> Gænt.	ameaux.	—	0,006	0,0002
Corylacées.	<i>Carpinus betulus</i> L.	Feuilles.	—	0,034	0,0035
Cupulifères.	<i>Quercus robur</i> L.	—	—	0,026	0,0017
Urticacées.	<i>Ficus carica</i> L.	Feuilles.	Corse.	0,008	0,0014
—	<i>Cannabis sativa</i> L.	Graines.	?	0,034	0,0043
Polygonacées.	<i>Polygonum fagopyrum</i> L.	Fruits.	?	0,056	0,0002
Crucifères.	<i>Sinapis alba</i> L.	Graines.	?	0,022	0,0022
—	<i>Thlaspi calaminare</i> Lej.	Racines.	Gîte calamin.	7,6	0,7448
—	—	Parties aériennes	de Moresnet.	3,05	0,4971
Violacées.	<i>Viola calaminaria</i> Sm.	Racines.	—	1,14	0,1345
—	—	Parties aériennes.	—	0,775	0,0835
—	<i>Viola tricolor</i> L.	Plante entière.	—	1,180	0,132
Caryophyllacées.	<i>Aisne verna</i> Berth.	—	—	2,419	0,265
Sapindacées.	<i>Æsculus hippocastanum</i> L.	Tige	Paris.	0,006	—
Ampéllidacées.	<i>Vitis vinifera</i> L.	—	Nuits (C.-d'Or).	0,030	0,0037
Légumineuses.	<i>Leus esculenta</i> Niauch.	Graines.	Auvergne.	0,116	0,0095
—	<i>Medicago sativa</i> L.	—	?	0,033	—
—	<i>Robinia pseudo-acacia</i> L.	Feuilles.	Lormes.	0,011	0,0011
Rosacées.	<i>Primus spinosa</i> Tourn.	Rameaux.	Nuits.	0,006	0,0005
Plombaginacées.	<i>Armeria elongata</i> Hoppn.	Racines.	Moresnet.	1,791	0,1175
—	—	Org. aériens	—	0,420	0,0459
Oléacées.	<i>Olea europæa</i> L.	Feuilles.	Corse.	0,017	0,0012
—	<i>Fraxinus excelsior</i> L.	—	Lormes.	0,004	0,0004
Gentianacées.	<i>Gentiana lutea</i> L.	Racine.	Auvergne.	0,074	0,0037
Solanacées.	<i>Solanum dulcamara</i> L.	Tige.	?	—	non caract.
Loganiacées.	<i>Strychnos nux vomica</i> L.	Graines.	?	0,006	0,0004
Scrophulariacées.	<i>Digitalis purpurea</i> L.	Feuilles.	Lormes.	0,037	0,0032
—	—	Graines.	Auvergne.	0,155	0,0053
Plantaginacées.	<i>Plantago lanceolata</i> L.	Racines.	Moresnet.	3,66	—
—	—	Tiges et feuilles	—	0,912	0,0875
Cucurbitacées.	<i>Bryonia dioica</i> Jacq.	Rhizôme.	Auvergne.	0,018	0,0010
Caprifoliacées.	<i>Sambucus nigra</i> L.	Rameaux av. feuilles.	Lormes.	0,014	0,0015
Composées.	<i>Arnica montana</i> L.	Inflorescences.	Auvergne.	0,020	0,0018
—	<i>Tussilago farfara</i> L.	Feuilles.	?	0,044	0,0037
Champignons.	<i>Psalliota campestris</i> L.	Pied et chapeau.	?	0,056	0,0102
—	<i>Polyporus officinalis</i> Fr.	Chapeau.	?	0,134	0,0021
Algues.	<i>Laminaria sacch. Larux</i>	Thalle.	Manche.	0,007	0,0010
—	<i>Fucus vesiculosus</i> L.	—	—	0,008	0,0019
Crypt. vasc.	<i>Equisetum limosum</i> L.	Plante entière.	Tours.	—	non caract.
—	<i>Pteris aquilina</i> L.	Frondes.	Essen.	0,160	0,0239
—	<i>Polystichum filix-mas</i> R.	Rhizômes.	?	0,129	0,0060



Quelques faits d'ordre général peuvent se dégager de ces analyses. C'est d'abord la présence constante, ou presque, du zinc chez les plantes. Si nous faisons abstraction des plantes dites calaminaires et des plantes recueillies sur des sols très zincifères, tels le *Plantago*, recueilli à Moresnet et le *Pteris* d'Essen, on voit que presque toutes les autres renferment des quantités non négligeables de zinc. Il ne me paraît donc plus possible d'écrire, comme avait cru pouvoir le faire DEHÉRAIN dans son excellent traité de chimie agricole : « l'oxyde de zinc se rencontre dans les cendres des plantes qui se développent sur les sols voisins des mines de zinc. » En fait, il faut dire qu'il est très commun dans les cendres des végétaux, au même titre que l'oxyde de fer ou l'oxyde de manganèse.

Ce métal est présent dans tous les organes des plantes, racines, tiges, feuilles, fleurs, graines des phanérogames, chapeau des champignons ou thalle des algues. Je ne puis d'ailleurs pas dire s'il se localise de préférence dans tel membre du végétal.

Il faut noter son abondance particulière dans les plantes de la famille des conifères. Il y a là, à mon sens, une véritable caractéristique, au point de vue chimique, des conifères, aussi curieux que la richesse de leurs cendres en manganèse et la présence de manno-cellulose dans leur bois.

Quant aux plantes dites calaminaires, on voit que le taux du zinc peut atteindre chez elles des chiffres extrêmement élevés<sup>1</sup> : elles jouissent vis-à-vis de ce métal d'une capacité d'accommodation tout à fait remarquable.

\* \* \*

La présence du zinc chez les plantes possède-t-elle un intérêt physiologique? Evidemment ce peut être un fait tout à fait banal. Il y a longtemps que des expériences de TRINCHINETTI, reprises par DEHÉRAIN, ont montré que les racines des plantes absorbent tous les éléments, même inutiles ou dangereux, des milieux dans lesquels on les fait vivre. Pourtant il y avait dans la littérature scientifique un exemple tout à fait classique, où l'intervention du zinc apparaissait comme indispensable à la

1. On a publié déjà de nombreuses observations sur la teneur en zinc des plantes croissant sur des sols calaminaires (BRAUN, RISSE, JEUSCH, etc.). On en trouvera le détail avec les indications bibliographiques dans la thèse précédemment signalée.

végétation d'une moisissure, l'*Aspergillus niger* V.Tgh. Je fais allusion ici au travail bien connu de RAULIN. On sait comment les faits mis en évidence par ce savant ont été contredits, et comment j'ai pu, par l'application d'une technique rigoureuse, non seulement les rétablir, mais encore en accroître la signification et l'intérêt<sup>1</sup>. J'ai montré, en effet, qu'une dose extraordinairement petite de zinc — 1/50,000,000 du milieu de culture par exemple — est utilisée par la moisissure qui fixe le métal et, grâce à lui, accroît singulièrement de poids; j'ai montré que 1/10,000,000 de zinc dans le milieu suffit pour faire atteindre à la mucédinée son poids maximum. L'*Aspergillus* constitue un véritable réactif biologique du zinc, réactif merveilleusement sensible, puisqu'il en décèle le cinquante millionième et permet, dans des conditions déterminées, de faire de véritables dosages au demi-centième de milligramme.

Cette action du zinc était-elle spécifique? Il y avait lieu de penser qu'elle ne l'était pas. Aussi ai-je tout de suite cherché à retrouver des faits du même ordre avec d'autres végétaux : j'ai choisi dans ce but des levures et diverses plantes phanérogames.

J'ai étudié à ce point de vue deux levures : l'une, une levure du Bordelais, qui vit très facilement en voile à la surface de ses milieux de culture, en large aérobiose par conséquent, et en cela très comparable à l'*Aspergillus*; l'autre, une levure du Gard, se comportant au contraire en ferment alcoolique. Ces deux levures ont fourni des résultats dont le rapprochement est très instructif.

En faisant vivre la première, la levure-végétal, sur un milieu approprié renfermant des sels minéraux, et, comme aliments organiques, de l'acide tartrique et du saccharose, j'ai vu que l'addition de très petites quantités de zinc permet de multiplier les récoltes par 2, 3 et même par 4. Voici, par exemple, le chiffre d'une expérience :

1. *C. R.*, t. CXLV., p. 1212 (1907), et t. CXLVI, t. p. 365 (1908).

Dilution du zinc.	Levure obtenue.	Sucre consommé.
Pas de zinc.....	0gr,322.....	5gr,2
1/10,000,000.....	0gr,350.....	3gr,8
1/1,000,000.....	0gr,968.....	12gr,25
1/100,000.....	1gr,087.....	18gr,50
1/10,000.....	1gr,483.....	19gr,

Les faits, dont je ne puis ici reproduire le détail, montrent que l'action du zinc sur la levure expérimentée est de même sens que pour l'*Aspergillus*. Mais la levure « réagit au zinc », si je puis m'exprimer ainsi, moins vivement que la moisissure. Avec des doses inférieures au dix-millionième, on n'observe pas d'action très manifeste, on reste dans la zone d'accroissement des récoltes depuis 1/10,000,000 jusqu'à 1/10,000, mais l'on peut obtenir des cultures encore très prospères en présence de 1/1000 de zinc. Moindre sensibilité aux très petites doses, résistance plus grande aux doses élevées, tels sont les caractères qui, dans ses relations avec le zinc, différencient notre levure de l'*Aspergillus*, mais les faits restent de même sens.

Il n'en est pas de même quand on étudie la levure-ferment. Celle-ci fonctionne surtout comme l'organisme sécréteur de zymase, et c'est l'action du zinc sur cette zymase qui donnera au phénomène son orientation. Or, l'expérience montre qu'à des doses où le zinc agit énergiquement sur la multiplication de la levure-végétal, il n'exerce aucune action appréciable sur la fermentation. Il y a là une opposition qui n'est pas sans intérêt. On la retrouvera quand on étudiera le mécanisme d'action du zinc.

L'étude de l'action que de petites quantités de zinc exercent sur les plantes vertes pouvait présenter un intérêt considérable. On sait à quels surprenants résultats on est arrivé en France, au Japon, aux États-Unis, par l'emploi du manganèse comme « engrais complémentaire ». Des quantités relativement très petites de cet élément ont suffi pour élever les récoltes de certaines graminées, riz, avoine, de 25, 40 et même 50 0/0. Il

1. Cf. G. BERTRAND, Sur l'emploi favorable du manganèse comme engrais. *C. R.*, CXXI, p. 1255 (1905).



n'était pas illégitime d'espérer des améliorations du même ordre avec des quantités de zinc bien plus petites encore, de telle sorte que la question théorique que j'essayais de trancher se doublait d'un problème pratique d'un très grand intérêt économique. J'ai, pendant deux années, fait les études de laboratoire qui doivent naturellement précéder les expériences de plus grande envergure.

Pour résoudre la question théorique, j'ai appliqué la méthode classique des cultures en solution nutritives, m'efforçant de la perfectionner afin de mieux assurer l'exactitude des résultats. Il faut d'ailleurs dire que cette étude expérimentale ne se présente pas avec la relative simplicité des expériences faites sur des levures ou des moisissures. Il n'est pas aisé d'assurer l'asepsie de la semence, de conserver stériles les milieux de culture, de comparer des plants ne différant rigoureusement entre eux que par le facteur de variation volontairement introduit. Il est surtout tout à fait impossible de réaliser une expérience-témoin dans laquelle n'interviendrait pas trace de zinc ; la graine elle-même en apporte une petite réserve, et il y a là, à l'origine, une inévitable cause d'erreur. Quoi qu'il en soit, j'ai pu établir, en me servant de blé comme sujet d'expérience, que l'introduction de doses faibles de zinc (de  $1/5,000,000$  à  $1/250,000$  par exemple, dans les conditions expérimentales où je me plaçais) augmente les rendements en poids sec de cette graminée ; cette augmentation de poids porte surtout sur la tige et les feuilles ; les racines sont très sensibles au zinc, au moins lorsqu'on leur offre ce métal sous une forme soluble, celle de sulfate par exemple ; pour des doses qui augmentent encore notablement le poids des organes verts, les racines, directement en contact avec la solution nutritive, diminuent déjà de diamètre et réduisent leur appareil vasculaire. J'ai dosé le zinc fixé par les organes aériens et les racines des blés expérimentés et j'ai montré que le blé, en cela beaucoup plus sensible à l'action toxique du zinc que l'*Aspergillus* ou la levure, n'en peut fixer, sans dommage, plus de  $7/10000$  de son poids sec.

Ces expériences de laboratoire, en montrant que les plantes vertes peuvent, dans certaines conditions, bénéficier comme les plantes sans chlorophylle, de la présence du zinc dans leur

sol, incitent aussi à quelque prudence lorsqu'il s'agit de les étendre à la pratique agricole. Nous avons, M. BERTRAND et moi, commencé des essais dans cet ordre d'idées. Nous avons obtenu des résultats encourageants en associant, comme agents catalytiques, le manganèse et le zinc dans des engrais complexes. Nous ne nous croyons d'ailleurs pas en droit d'insister sur des résultats qui n'ont pas encore reçu la sanction d'une expérience assez prolongée.

\*  
\* \*

Caractériser dans la plante un élément, reconnaître qu'il est indispensable, ou au moins utile à son développement, c'est ne remplir qu'une partie du programme que comporte une pareille étude. Pour beaucoup des éléments caractérisés à l'état de traces chez les êtres vivants, tels que l'arsenic ou le bore, nous ne sommes pas beaucoup plus avancés.

Pour quelques-uns, tels que l'iode ou le manganèse, nous le sommes davantage : nous les voyons entrer dans des combinaisons organiques comme l'iodothyroïne, ou des complexes diastatiques comme la laccase, et ainsi s'éclaire une partie au moins de leur rôle physiologique. Il y a, dans cet ordre d'idées, des essais à tenter pour tous les autres éléments catalytiques. Il ne me paraît pas douteux que pour le zinc, dont j'ai établi la diffusion chez les plantes, et mis en lumière l'action biologique, la voie ne soit ouverte à de curieuses observations.

---

# Sur le mécanisme de la réaction Bordet-Gengou

## PREMIER MÉMOIRE

PAR LE D<sup>r</sup> MILTON CRENDIROPOULO,

Directeur du laboratoire bactériologique du Conseil quarantenaire à Alexandrie (Égypte).

---

Depuis que Wassermann a eu l'idée d'appliquer la réaction de Bordet et Gengou au diagnostic de la syphilis, ce procédé a attiré l'attention d'un grand nombre de bactériologues. Son étude a provoqué une foule de travaux qui, malgré leur valeur différente mais réelle, n'ont pu donner encore une explication satisfaisante du phénomène.

Il y a déjà longtemps que Neisser et Weschberg <sup>1</sup> ont remarqué que, quand on mettait en présence de globules rouges ou de microbes, un excès de leur sérum spécifique et une quantité relativement faible d'alexine, la réaction que ce mélange devait donner n'avait plus lieu. Ils expliquaient le phénomène par la déviation du complément. Ils croyaient que les ambocepteurs libres, contenus dans le liquide, absorbaient une partie du complément, qui n'était plus alors en quantité suffisante pour compléter les ambocepteurs fixés sur les cellules. Mais Morgenroth <sup>2</sup>, étudiant le phénomène sur le sérum hémolytique, a établi que les ambocepteurs en excès n'auraient pu fixer le complément que s'ils possédaient pour lui une affinité supérieure (ou au moins égale) à celle des ambocepteurs fixés. Or, les travaux d'Ehrlich et de son école, ainsi que ceux de Bordet, ont mis en évidence que les ambocepteurs hémolytiques, fixés sur les hématies, manifestaient une affinité considérable pour le complément. Le dernier des auteurs cités soutenait même que ceux-ci seuls sont capables de fixer le complément. C'est pour prouver cette avidité qu'il a imaginé l'expérience connue sous le nom de la réaction de fixation et qui fait l'objet du présent travail.

Son principe est le suivant. Le complément ne se fixe sur l'ambocepteur que si celui-ci est déjà fixé sur l'antigène. Il en résulte que si, par un moyen quelconque, on réussit à faire

1. *Munch. m. Woch.*, n° 18, 1901.

2. *Genr. für Bact.*, Bd. 35, n° 4.



absorber le complément, on le met hors d'action et, par conséquent, dans l'impossibilité de s'unir à un second ambocepteur qu'on ajoute consécutivement.

Cette théorie présuppose l'unité du complément, unité qui est contestée par Ehrlich et son école. Elle a donc été fortement attaquée. Nous ne suivrons pas cette longue polémique qui n'entre point dans le cadre de notre travail. Nous nous bornerons à citer le travail de Moreschi <sup>1</sup>. En traitant des lapins avec de l'alexine de chèvre, cet auteur a trouvé que le sérum spécifique qu'il obtenait neutralisait bien le complément de la chèvre, mais était sans action sur celui des autres animaux, à moins qu'il n'ajoutât une trace de sérum normal de chèvre chauffé à 55°. Il en concluait qu'il s'agit d'un pouvoir anticomplémentaire du sérum qui, pour entrer en fonction, a besoin de deux substances : l'une, qui se trouve dans le sang des animaux traités et l'autre, qui existe normalement dans l'antigène qui a servi au traitement. Il a pourtant soin d'ajouter, dans la deuxième conclusion de son travail, que « l'action anticomplémentaire est associée avec le phénomène de la précipitation. »

Gay est encore plus affirmatif <sup>2</sup>. Il arrive à ce résultat que le phénomène de Bordet et Gengou ne repose pas sur l'action d'un ambocepteur, mais bien sur celle d'une précipitation. Pour lui c'est le précipité formé, visible ou non, qui fixe l'alexine. Il y a par conséquent fixation et non action anticomplémentaire. Moreschi, en revenant sur la question, en collaboration avec Pfeiffer <sup>3</sup>, est d'avis que le vrai facteur dans la réaction est le précipité, qui entraîne ou détruit le complément. Ulhenhuth et Moreschi <sup>4</sup>, Browning et Sachs <sup>5</sup>, Friedberger et Moreschi <sup>6</sup> arrivent aux mêmes résultats.

Wassermann et Bruck <sup>7</sup>, qui ont étudié les deux phénomènes parallèlement, ont fait faire un grand pas à la question, en employant non plus des émulsions bactériennes, comme on le faisait jusqu'alors, mais des extraits des corps bacillaires et des substances bactériennes dissoutes.

1. *Berl. klin. Woch.*, n° 37, 1905.

2. *Cent. f. Bact.*, Bd 35, 1905 et *Annales de l'Institut Pasteur*, octobre 1905.

3. *Berl. klin. Woch.*, n° 2, 1906.

4. *Berl. klin. Woch.*, n° 4, 1906.

5. *Berl. klin. Woch.*, nos 21 et 22, 1906.

6. *Berl. klin. Woch.*, n° 31, 1906.

7. *Berl. klin. Woch.*, n° 55, 1905.

Ils ont remarqué que ces extraits ont la propriété de former, en présence des immunsérums, des précipités volumineux, propriété qu'ils perdent complètement après quelques jours. Profitant de cette propriété, inconnue jusqu'alors, ils ont cherché à voir si les extraits frais des bactéries, c'est-à-dire ceux qui formaient un volumineux précipité, absorbaient le complément en plus grande quantité que les vieux extraits qui ne précipitaient plus. Leur étude comparative les a conduits à ce résultat que les deux phénomènes sont indépendants l'un de l'autre.

Si, en effet, il y a dans quelques cas un parallélisme manifeste, souvent les vieux extraits fixent le complément aussi bien que les neufs. Pour ces auteurs, la réaction est due à ce que les ambocepteurs, après leur union avec l'antigène, absorbent le complément; il y a, par conséquent, fixation dans toute l'acception du mot.

Muir et Martin<sup>1</sup> ont aussi remarqué que la déviation du complément peut prendre place sans qu'il y ait de précipité visible; mais, pratiquement, la substance qui produit la déviation se confond avec celle qui produit la précipitation.

Ulhenhuth<sup>2</sup>, de son côté, trouve qu'une grande quantité de substances non spécifiques peuvent fixer l'alexine et empêcher par conséquent l'hémolyse. Tels sont : le carton, la terre, la paille, le pain, l'urine, la tuberculine, plusieurs sérums non dilués et diverses autres substances. Plus tard, Seligmann<sup>3</sup> a obtenu la fixation du complément par des précipités chimiques et même par une réaction colloïdale sans précipitation.

Ayant entrepris, dans un travail antérieur, de différencier les vibrions entre eux au moyen de la réaction Bordet-Gengou, nous avons vu nos conclusions attaquées et la valeur de l'épreuve mise en doute. Avant de discuter, à l'aide de nouvelles expériences, le bien ou le mal fondé des arguments qu'on nous a opposés, nous avons voulu aller plus avant dans la connaissance du mécanisme de la déviation du complément, et établir, si possible, les conditions dans lesquelles ce phénomène s'accomplit. C'est cette partie de notre travail que nous publions aujourd'hui.

Nous examinerons donc successivement les facteurs en jeu

1. *Journ. of. hyg.*, t. VI, 1906.

2. *Deuts. med. Woch.*, nos 31 et 31, 1906.

3. *Berl. klin. Woch.*, n° 32, 1907.

dans leurs rapports les plus simples. Nous chercherons à voir quelle est l'action de chaque élément sur un autre, puis sur plusieurs, ou tous à la fois. Enfin, nous étudierons la réciprocité de ces actions.

## I

### ACTIONS DES VIBRIONS SUR L'ALEXINE

Comme nous l'avons déjà fait remarquer, plusieurs auteurs ont vu que l'alexine se fixe non seulement sur les microbes, sans l'intermédiaire d'un autre agent, mais aussi sur des substances absolument inertes et nullement spécifiques. Michaelis<sup>1</sup>, en expérimentant sur le foie syphilitique, a vu que le foie normal absorbe une quantité d'alexine assez grande, et, dernièrement, Levaditi faisait la même réflexion à la Société de Biologie. Nos expériences nous démontrent que les vibrions peuvent absorber une quantité d'alexine relativement considérable, sans avoir besoin, pour cela, d'un corps intermédiaire.

Exp. 1. — Nous ensemençons, sur agar, sept vibrions différents. Parmi ceux-ci il y en a qui agglutinent sous l'influence du sérum anticholérique, comme les vibrions de Marseille, le Tor 6 et le C K; les autres n'agglutinent point; tels sont les vibrions de Massaoua, de Finkler et Prior, de Metchnikoff et notre 98. Avec chacune de ces cultures, nous faisons une émulsion telle qu'un c.c. d'eau salée à 7 1/000 contienne une anse de platine de microbes et nous chauffons une partie de cette émulsion à 70° pendant une demi-heure. Puis, nous diluons toutes ces émulsions, chauffées ou non, de façon que chaque série de tubes contienne pour 1 c.c. d'eau physiologique 1/10, 1/5, 1/2 et une anse entière de platine. Nous ajoutons dans chaque tube 0,1 c.c. d'alexine de lapin et nous laissons pendant une heure à l'étuve à 36°. Après ce laps de temps, nous versons dans tous les tubes, 1 c.c. d'une émulsion à 5 0/0 de globules de bœuf, cinq fois lavés et sensibilisés avec un sérum de lapin hémolytique pour ces hématies, nous remettons à l'étuve pendant une heure et nous laissons à la température du laboratoire (22°).

<sup>1</sup> *Berl. klin. Woch.*, n° 7, 1908.



# EXPÉRIENCE I MICROBES MORTS

Numéros d'ordre.	Quantité de vibrions contenue dans 1 c. c. d'eau salée.	VIBRIONS CK		V. MASSAOUA		V. TOR 6		V. 98		V. FINKLER		V. MARSEILLE		V. METCHNIKOFF	
		3 heures après.	24 heures après.	3 heures après.	24 heures après.	3 heures après.	24 heures après.	3 h. après.	24 h. après.	3 heures après.	24 heures après.	3 heures après.	24 heures après.	3 heures après.	24 heures après.
1	1/10 d'anse.	+++	+++	++	+++	++	+++	0	++	++	+++	++	+++	++	+++
2	1/5 »	++	+++	+	+++	++	+++	0	++	++	+++	++	+++	0	++
3	1/2 »	0	++	0	++	0	++	0	+	0	++	+	++	0	++
4	1 anse.	0	++	0	++	0	+	0	0	0	+	0	+	0	+

Hémolyse complète = ++++. Hémolyse prononcée = ++.

Hémolyse faible = ++. Hémolyse minime = +.

Hémolyse nulle = 0.

## EXPÉRIENCE II

## MICROBES VIVANTS

N <sup>os</sup> d'ordre	Quantité de vibrions contenue dans 1 c. c. d'eau salée.	Vibrions CK	V. Massoua.	V. Tor 6.	V. 98.	V. Finkler.	V. Marseille.	V. Metchnikoff.
		3 h. 24 h.	3 h. 24 h.	3 h. 24 h.	3 h. 24 h.	3 h. 24 h.	3 h. 24 h.	3 h. 24 h.
1	4/10 d'anse	++	++	++	0	++	++	++
2	1/3 —	0	++	+	0	++	+	++
3	1/2 —	0	0	0	0	0	+	+
4	1 anse	0	0	0	0	0	0	0

Ces expériences nous montrent, d'une façon générale, que les vibrions ont la faculté d'absorber l'alexine d'autant plus énergiquement qu'ils sont plus nombreux. Elles nous enseignent encore que, parmi les différentes espèces de vibrions, il y en a qui la fixent plus avidement que les autres et, enfin, que les vibrions morts l'absorbent bien moins et surtout plus uniformément que les vivants.

Mais pour avoir une idée de la quantité énorme d'alexine qu'il faut pour saturer ces vibrions, on n'a qu'à jeter un coup d'œil sur le tableau suivant.

Nos d'ordre	Quantité de vibrions	Eau physio- logique	Alexine de lapin.	Vib. CK.		V. Tor. 6.		V. Marseille.		V. 98.	
				3 h.	24 h.	3 h.	24 h.	3 h.	24 h.	3 h.	24 h.
1	1 anse	0,9 c. c.	0,1 c. c.	O	O	O	O	O	O	O	O
2	»	0,8 c. c.	0,2 c. c.	O	+	O	O	O	O	O	O
3	»	0,7 c. c.	0,3 c. c.	+	++	O	O	+	++	O	O
4	»	0,6 c. c.	0,4 c. c.	++	+++	O	+	++	+++	O	O
5	»	0,5 c. c.	0,5 c. c.	++++	++++	+	++	++++	++++	O	+

Le mélange microbe + eau + alexine est resté une heure à l'étuve et, après, on a ajouté l'émulsion des globules sensibilisés. Celle-ci, pour toutes nos expériences, se composait de globules de bœuf cinq fois lavés, étendus au 20<sup>e</sup> dans l'eau physiologique et sensibilisés avec 0,02 c.c. de sérum hémolytique de lapin pour un c. c. d'émulsion. La quantité du système hémolytique que chaque tube recevait était régulièrement de 1 c. c.

Les quantités d'alexine que chaque espèce de vibrions vivants peut absorber ne sont pas constantes. Nous possédons des expériences dans lesquelles une anse de CK est arrivée à fixer 0,3 c.c. d'alexine et d'autres, dans lesquelles la même quantité de Tor 6 n'a pu absorber 0,2 c. c. Ceci dépend naturellement de la teneur en complément du sérum frais, teneur qu'il est impossible de connaître. On ne voit pas ces grandes quantités absorbées quand on emploie le sérum frais de lapin (en général pauvre en complément), mais aussi, quoique à un taux inférieur, quand on fait usage du sérum de cobaye (ordinairement très riche en alexine).

La quantité de microbes n'est pas seule à influencer la fixa-



tion de l'alexine, le temps pendant lequel les deux éléments se trouvent en contact à une action réelle.

Exp. 4. — Dans l'expérience suivante, le vibrion essayé est notre 98, qui a un grand pouvoir absorbant. Un cinquième d'anse de platine, d'une culture sur agar de 24 h. est émulsionné dans 0,7 c. c. d'eau physiologique. A cette émulsion est ajouté 0,1 c. c. d'alexine de lapin; puis, immédiatement ou à des intervalles de temps marqués sur le tableau, on ajoute 1 c. c. du système hémolytique. Les microbes sont chauffés à 70° pendant une demi-heure.

Numéros d'ordre.	SYSTÈME hémolytique ajouté.	30 minutes.	45 minutes.	1 heure.	2 heures.	3 heures.	24 heures.
1	Immédiatement.	+++	++++				
2	Après 45 minutes.	+	+++	++++			
3	— 30 —	0	0	+	++	++	+++
4	— 1 heure.	0	0	0	0	0	+
5	— 2 heures.	0	0	0	0	0	+

Le complément ne commence à se fixer qu'au bout d'une heure.

Voici une autre expérience faite avec les mêmes vibrions vivants provenant de la même culture.

Nos d'ordre.	SYSTÈME hémolytique ajouté.	30 m.	45 min.	1 h.	2 h.	3 h.	24 h.
1	Immédiatement.	+++	++++				
2	Après 45 min.	0	+	++	++	+++	++++
3	— 30 min.	0	0	0	0	0	++
4	— 1 h.	0	0	0	0	0	0
5	— 2 h.	0	0	0	0	0	0

Les vibrions ont donc la propriété de fixer l'alexine sans le concours d'aucun adjuvant; et, pour certaines espèces, cette propriété est très développée. Le pouvoir fixateur des vibrions ne varie pas seulement d'une espèce à l'autre, mais aussi pour les diverses cultures d'une seule et même race.

## II

## ACTION DES VIBRIONS SUR LE SÉRUM SPÉCIFIQUE

Si nous laissons les microbes en contact avec le sérum spécifique, quels sont les phénomènes qui vont se produire ?

Examinons d'abord ce que devient l'immunsérum après son contact avec les microbes.

Une épaisse émulsion du vibron CK est mélangée avec du sérum anticholérique, de façon que celui-ci soit dans la proportion de 20 0/0. Le mélange est resté à l'étuve à 36° pendant une heure, puis longuement centrifugé. Le liquide surnageant est décanté et mis en proportions diverses dans des tubes dans lesquels on verse 0,1 c. c. d'alexine de lapin. On remet le nouveau mélange à l'étuve pendant une heure, puis, on ajoute le système hémolytique. Les tubes témoins contiennent les mêmes quantités de l'immunsérum, qui n'a pas subi le contact des microbes. Les quantités réelles de sérum que chaque tube contient sont notées, dans une colonne à part, dans le tableau suivant :

N <sup>o</sup> d'ordre.	Dilution du sérum traité.	Dilution du sérum non traité.	Alexine de lapin.	Eau physiologique.	Système hémolytique.	Quantités réelles des sérums.	RÉSULTAT APRÈS			
							30 m.	1 heure.	2 heures.	24 heures.
1	0,9 c. c.	—	0,1 c. c.	—	1 c. c.	0,48 c. c.	O	O	O	O
2	0,5 —	—	0,1 —	0,4 c. c.	—	0,1 —	O	O	O	+
3	0,3 —	—	0,1 —	0,6 —	—	0,06 —	O	O	+	+++
4	0,1 —	—	0,1 —	0,8 —	—	0,02 —	O	++	+++	++++
5	—	0,9 c. c.	0,1 —	—	—	0,48 —	++	+++	++++	
6	—	0,3 —	0,1 —	0,6 —	—	0,06 —	++	+++	++++	

Voici une autre expérience faite avec le même vibron et le même sérum, dont les résultats sont moins précis.

Exp. 7. — Une culture sur agar, du vibron CK, est émulsionnée dans 1 c. c. 2 d'eau physiologique et versée dans un tube à centrifuger contenant 0,8 c. c. de sérum anticholérique. Une heure de contact à l'étuve, centrifugation, décantation et répartition du liquide surnageant dans des tubes (en proportions diverses). On verse, dans chacun de ces tubes, 0,1 c. c. d'alexine de lapin ; on laisse une heure à l'étuve, puis on ajoute le système hémolytique.

Nos d'ordre.	Dilution du sérum traité.	Dilution du sérum non traité.	Alexine de lapin.	Eau physiologique.	Système hémolytique.	Quantités réelles des sérums.	RÉSULTATS APRÈS			
							30 m.	1 heure	2 h.	24 heures.
1	0,9 c. c.	—	0,1 c. c.	—	1 c. c.	0,36 c. c.	O	O	+	++
2	0,5 —	—	—	0,4 c. c.	—	0,2 —	O	O	++	+++
3	0,3 —	—	—	0,6 —	—	0,09 —	O	+	+++	+++
4	—	0,9 c. c.	—	—	—	0,36 —	++	+++	+++	++++
5	—	0,3 —	—	0,6 —	—	0,09 —	++	+++	+++	++++

Une troisième expérience va nous donner des résultats meilleurs.

Exp. 8. — Dans un tube à centrifuger, contenant 1 c.c. 8 d'eau physiologique et 0,2 c.c. de sérum spécifique, on délaie 8 anses de platine d'une culture sur agar du vibron CK. On laisse une heure à l'étuve, puis on centrifuge et l'on décante. On répartit le liquide dans trois tubes, en proportions diverses, on ajoute à chacun 0,1 c.c. d'alexine de lapin, on laisse une heure à l'étuve et on ajoute le système hémolytique.

Nos d'ordre.	Dilution du sérum traité.	Dilution du sérum non traité.	Alexine de lapin.	Eau physiologique.	Système hémolytique.	Quantités réelles des sérums.	RÉSULTAT APRÈS			
							30 m.	1 heure.	2 heures.	4 heures.
1	0,9 c.c.	—	0,1 c. c.	—	1 c. c.	0,09 c.c.	O	O	O	O
2	0,5 —	—	—	0,4 c. c.	—	0,045 —	O	+	++	+++
3	0,3 —	—	—	0,6 —	—	0,027 —	+	++	+++	++++
4	—	0,9 c. c.	—	—	—	0,09 —	++	+++	+++	++++
5	—	0,3 —	—	0,6 —	—	0,027 —	++	+++	+++	++++

Nous ne citons que trois des nombreuses expériences que nous avons exécutées, parce qu'elles sont suffisantes pour montrer que le sérum spécifique, après contact avec les microbes, acquiert une propriété nouvelle. Mais ce fait n'est pas constant. Quelquefois, malgré un contact prolongé, le sérum reste incapable de neutraliser la moindre trace d'alexine; il se comporte comme un immunosérum qui n'a subi aucun traitement. Tous les expérimentateurs qui ont essayé le procédé de Wassermann comme méthode de diagnostic sont d'accord sur ce point.



Wassermann lui-même et ses collaborateurs, sur 163 cas de syphilis floride, trouvent la réaction positive dans 75 0/0 et dans 58 0/0 seulement lors de syphilis latente. Le sérum des singes syphilités ne présente la déviation du complément que dans la proportion de 58 0/0. Les recherches de Citron, de Mayer, de Marie et Levaditi, de Fischer et tant d'autres arrivent à la même conclusion. L'inconstance du phénomène est donc la règle générale, même quand on ne regarde pas le résultat final (mais que l'on tient uniquement compte du retard que l'hémolyse met à se produire); on voit que la réaction peut varier dans des limites très larges, ce que démontrent les expériences suivantes.

EXP. 9. — Dans 3 tubes à centrifuger, contenant 0,6 c. c. d'eau physiologique et 0,4 c. c. de sérum anticholérique, on délaie 4 anses de platine d'une culture sur agar de CK. On met une heure à l'étuve, puis on centrifuge, on décante et l'on verse le liquide décanté dans 3 différents tubes; on ajoute des quantités variées d'alexine de lapin et la quantité nécessaire d'eau physiologique pour compléter 1 c. c. On remet à l'étuve pendant une heure, puis on ajoute le système hémolytique. La quantité réelle d'immunsérum que contient chaque tube est de 0,36 c. c.

N <sup>o</sup> d'ordre	Dilution du sérum traité.	Dilution du sérum non traité.	Alexine de lapin.	Eau physiolo- gique.	Système hémoly- tique.	RÉSULTAT APRÈS			
						30 m.	1 h.	2 h.	24 h.
1	0,9 c. c.	—	0,08 c. c.	0,02 c. c.	1 c. c.	0	0	0	++
2	0,9 c. c.	—	0,05 c. c.	0,05 c. c.		0	0	0	+
3	0,9 c. c.	—	0,02 c. c.	0,08 c. c.		0	0	0	0
4	—	0,9 c. c.	0,05 c. c.	0,05 c. c.		+	++	++	++++
5	—	0,9 c. c.	0,02 c. c.	0,02 c. c.		0	+	++	++

Dans l'expérience suivante, les matériaux et les quantités sont les mêmes.

EXPÉRIENCE 10

Nos d'ordre.	Dilution du sérum traité.	Dilution du sérum non traité.	Alexine d: lapin.	Eau physiologique.	Système hémolytique.	RÉSULTAT APRÈS			
						30 m.	1 h.	2 h.	24 h.
1	0,9 c. c.	—	0,1 c. c.	—	1 c. c.	0	0	+	++
2	0,9 c. c.	—	0,08 c. c.	0,02 c. c.		0	0	0	0
3	0,9 c. c.	—	0,05 c. c.	0,05 c. c.		0	0	0	0
4	0,9 c. c.	—	0,02 c. c.	0,08 c. c.		0	0	0	0
5	—	0,9 c. c.	0,05 c. c.	0,05 c. c.		++	++	+++	+++
6	—	0,9 c. c.	0,02 c. c.	0,08 c. c.		+	+	++	+++

Dans l'expérience qui suit, le retard est presque nul. Le sérum n'a acquis aucun pouvoir d'empêcher l'hémolyse.

EXPÉRIENCE 11

Nos d'ordre.	Dilution du sérum traité.	Dilution du sérum non traité.	Alexine de lapin.	Eau physiologique.	Système hémolytique.	RÉSULTAT APRÈS			
						30 m.	1 heure.	2 heures.	24 h
1	0,9 c. c.	—	0,1 c. c.	—	1 c. c.	++	+++	++++	—
2	0,9 —	—	0,08 c. c.	0,02 c. c.	—	++	+++	+++	+++
3	0,9 —	—	0,05 —	0,05 —	—	+	+	+	++
4	0,9 —	—	0,02 —	0,08 —	—	0	+	++	++
5	—	0,9 c. c.	0,05 —	0,05 —	—	++	+++	+++	+++
6	—	0,9 —	0,02 —	0, —	—	0	+	++	++

Peut-être les variations du pouvoir antibémolytique de l'immunsérum tiennent-elles aux conditions de nos expériences. Examinons donc, séparément, l'influence que peuvent avoir, sur le phénomène, la quantité des microbes, le temps de contact avec le sérum et la quantité de ce dernier.

Commençons par la quantité des vibrions.

Exp. 12. — Dans chacun des 3 tubes à centrifuger contenant chacun 0,6 c. c. d'eau physiologique et 0,4 c. c. de sérum anticholérique, on délaie une anse de platine du vibron CK. Les mélanges restent une heure à l'étuve

et sont centrifugés. Les liquides surnageants sont décantés et versés chacun dans un tube auquel on ajoute de l'alexine de lapin. Après une heure d'étuve, on ajoute le système hémolytique.

Nos d'ordre	Dilution du sérum traité.	Dilution du sérum non traité.	Alexine de lapin.	Eau physiologique.	Système hémolytique.	RÉSULTAT APRÈS			
						30 m.	1 heure.	2 heures.	24 h.
1	0,9 c. c.	—	0,08 c. c.	0,02 c. c.	1 c. c.	0	0	0	+
2	0,9 —	—	0,05 —	0,05 —	—	0	0	0	0
3	0,9 —	—	0,02 —	0,08 —	—	0	0	0	0
4	—	0,9 c. c.	0,05 —	0,05 —	—	+	++	++	+++
5	—	0,9 —	0,02 —	0,08 —	—	0	+	++	++

Exp. 13. — Dans l'expérience qui suit, la même quantité de sérum est mise, dans chaque tube, en contact avec deux anses de platine du même vibron.

N° d'ordre.	Sérum traité.	Sérum non traité.	Alexine de lapin	Eau physiologique.	Système hémolytique.	RÉSULTAT APRÈS			
						30 m.	1 h.	2 h.	24 h.
1	0,9 c. c.	—	0,1 c. c.	—	0,1 c. c.	++++	—	—	—
2	0,9 c. c.	—	0,08 c. c.	0,02 c. c.	0,1 c. c.	+	++	++	+++
3	0,9 c. c.	—	0,05 c. c.	0,05 c. c.	0,1 c. c.	0	+	++	++
4	—	0,9 c. c.	0,08 c. c.	0,02 c. c.	0,1 c. c.	++++	—	—	—
5	—	0,9 c. c.	0,05 c. c.	0,05 c. c.	0,1 c. c.	++++	—	—	—

Exp. — Dans le tableau 14 nous présentons, côte à côte, le résultat de 2 expériences qui ne diffèrent des précédentes que par la quantité de microbes avec une égale quantité de sérum.

Nos d'ordre.	Quantité de culture mise en contact.	Dilution du sérum traité.	Dilution du sérum non traité.	Alexine de lapin.	Eau physiologique.	Système hémolytique.	RÉSULTAT APRÈS			
							30 m.	1 h.	2 h.	24 h.
1	1 culture	0,9 c. c.	—	0,1 c. c.	—	1 c. c.	0	0	+	++
2	»	0,9 c. c.	—	0,05 c. c.	0,05 c. c.	»	0	0	0	0
3	2 cultures	0,9 c. c.	—	0,01 c. c.	—	»	0	0	0	0
4	»	0,9 c. c.	—	0,05 c. c.	0,05 c. c.	»	0	0	0	0
5	—	—	0,9 c. c.	0,05 c. c.	0,05 c. c.	»	+	++	++	+++



Les expériences suivantes ont trait à l'influence que le temps de contact exerce sur le sérum.

Exp. 15. — 3 cultures sur agar du vibron CK sont délayées, chacune, dans 0,6 c. c. d'eau physiologique et placées dans 3 tubes à centrifuger dont chacun contient 0,4 c. c. de sérum anticholérique. Les mélanges restent à l'étuve pendant un laps de temps variable, au bout duquel ils sont centrifugés et les liquides surnageants décantés et transvasés dans 3 tubes ordinaires contenant chacun 0,05 d'alexine de lapin. Après une heure d'étuve, le système hémolytique est ajouté.

N <sup>o</sup> d'ordre.	Dilution du sérum traité.	Dilution du sérum non traité.	Alexine de lapin.	Eau physiologique.	Système hémolytique.	Temps de contact.	RÉSULTAT APRÈS			
							30 m.	1 h.	2 h.	24 h.
1	0,9 c. c.	—	0,05 c. c.	0,05 c. c.	1 c. c.	1 h.	O	O	O	++
2	0,9 c. c.	—	—	—	—	2 h.	O	O	O	O
3	0,9 c. c.	—	—	—	—	4 h.	O	O	O	O
4	—	0,9 c. c.	—	—	—	—	+	++	+++	++++

Exp. 16. — Le tableau suivant indique les résultats d'une expérience exécutée dans le même but, mais dans laquelle la quantité de microbes mise dans chaque tube est de 4 anses de platine.

N <sup>o</sup> d'ordre.	Dilution du sérum traité.	Dilution du sérum non traité.	Alexine de lapin.	Eau physiologique.	Système hémolytique.	Temps de contact.	RÉSULTAT APRÈS			
							30 m.	1 h.	2 h.	24 h.
1	0,9 c. c.	—	0,05 c. c.	0,05 c. c.	1 c. c.	30 m.	O	+	++	+++
2	0,9 c. c.	—	—	—	—	1 h.	O	O	+	+++
3	0,9 c. c.	—	—	—	—	3 h.	O	O	O	+
4	—	0,9 c. c.	—	—	—	—	+	++	++	+++

Ainsi, la quantité des vibrions et le temps pendant lequel ceux-ci restent en contact avec le sérum, ont une action manifeste sur l'apparition de la nouvelle fonction que l'immunsérum acquiert. Toutefois, cette influence est loin d'être absolue. Dans l'expérience 12, où le sérum a été en contact avec une seule anse de platine de vibrions, celui-ci montre un pouvoir antihémolytique plus grand que dans l'expérience 13, où il a été mélangé avec 4 anses du même microbe. En comparant les

résultats que donne le tube n° 2 de l'expérience 16 avec ceux que présente le tube n° 2 de l'expérience 9 (tubes absolument comparables), nous rencontrons des différences très sensibles en ce qui concerne le moment de l'apparition de l'hémolyse.

Il en est de même quand nous envisageons la quantité nécessaire de sérum spécifique. Si nous jetons un coup d'œil sur les expériences précitées, nous voyons, d'un côté, qu'une même quantité de sérum mis en contact avec une quantité déterminée de microbes donne des résultats très dissemblables. Telles sont les expériences 9, 10 et 11. Et, d'un autre côté, que ce ne sont pas toujours les plus grandes quantités de sérum qui donnent les meilleurs résultats. Par exemple, dans l'expérience 8, le 1<sup>er</sup> tube qui contient 0,09 c. c. de sérum ne présente aucune hémolyse, tandis que le 2<sup>e</sup> de l'expérience 6, qui en contient 0,1 c. c. donne une hémolyse légère au bout de 24 heures. D'autre part, le 1<sup>er</sup> tube de l'expérience 7, qui renferme 0,36 c. c. de sérum, commence à hémolyser déjà 2 heures après.

On dirait qu'en réalité la quantité du sérum spécifique n'a aucune influence et qu'il agit simplement par sa présence. Ce n'est pourtant pas tout à fait vrai. Quand on met l'immunsérum, en quantité trop petite, à digérer avec les microbes, les résultats sont absolument nuls; il faut monter quelquefois à 0,08 c. c. et même 0,15 c. c. de sérum pour voir le phénomène s'accomplir. Plusieurs expériences nous ont montré que ce n'est qu'à partir d'une certaine dose que le sérum commence à donner la réaction. Cette quantité est nécessaire pour amorcer l'expérience, les additions plus fortes ajoutent très peu aux résultats.

Mais cette dose minima est variable pour chaque sérum comme on devait s'y attendre. Ainsi, un sérum qui provient de l'Institut des maladies infectieuses de Berlin a donné, entre nos mains, un résultat très net à 0,1 c. c. et un autre, provenant de l'Institut sérothérapique de Berne, agit à 0,08 c. c., tandis qu'un de nos sérums anticholériques, préparé au laboratoire, ne commence à donner des résultats qu'à la quantité assez grande (0,15 c. c.).

En somme, aucun des facteurs que nous venons d'examiner n'exerce une action absolue sur l'apparition du pouvoir anti-hémolytique du sérum, aucun d'eux n'est capable, à lui seul, de

produire ce phénomène, et leur combinaison précise paraît difficile, sinon impossible à déterminer. Il faut croire aussi que certains vibrions confèrent, avec plus de facilité que d'autres, la propriété antihémolytique au sérum et que les diverses cultures d'un même vibron se comportent différemment à ce point de vue.

## II

Jusqu'à ce moment, nous n'avons parlé que du pouvoir antihémolytique que le sérum acquiert au contact des microbes contre lesquels il est préparé. Il nous faut maintenant rechercher quelle est la nature de cette action.

Exp. 17. — A cet effet, nous laissons agir, pendant quelque temps, l'immun-sérum décanté sur chacun des divers constituants de la réaction et nous ajoutons les autres ensuite. Quatre cultures sur agar, du vibron CK, sont délayées chacune dans 0,5 c. c. d'eau physiologique et versées dans un tube à centrifuger contenant 2 c. c. de sérum cholérique. Après 3 heures d'é-tuve, le mélange est centrifugé longuement et le liquide décanté est réparti dans 3 tubes, à raison de 0,08 c. c. pour chacun. Puis, au tube n° 1 on ajoute 0,05 de sérum hémolytique ; au n° 2, 0,05 c. c. de globules de bœuf lavés, et au n° 3, 0,1 c. c. d'alexine de lapin. On remet le tout pendant une heure à l'é-tuve et, ensuite, on complète chaque tube avec les éléments qui lui manquent.

						30 m.	2 h.	24 h.
1	Sérum 0,8 c. c.	S. hémol. 0,05 c. c.	1 h. d'é-tuve.	Glob. 0,05 c. c.	Alex. 0,1	+++	+++	++++
2	— —	Globules 0,05 c. c.		Alex. 0,1 c. c.	S. hém. 0,05	++++	++++	++++
3	— —	Alexine 0,1 c. c.		Glob. 0,05 c. c.	S hém. 0,05	O	O	O

Dans toutes nos expériences de ce genre, c'est toujours le tube n° 3 qui présentait la déviation du complément. Une seule fois, le tube n° 1 a donné un résultat positif. Nous sommes donc autorisé à conclure que cette action du sérum, nouvellement acquise, est dirigée contre l'alexine. Le sérum devient donc anticomplémentaire, c'est-à-dire qu'il empêche le complément d'agir en le fixant, le détruisant ou lui imprimant des changements moléculaires qui le rendent incapable de porter son action sur le système hémolytique.

Nous ferons remarquer, et nous insistons sur ce fait, que ce pouvoir est toujours médiocre. La quantité d'alexine que le sérum peut absorber est bien inférieure à celle que les microbes peuvent fixer par eux-mêmes.

Ceci est tellement vrai que les auteurs qui se sont occupés de la réaction de Wasserman, comme Levaditi, Martin et Browning, Wasserman lui-même et ses collaborateurs, recommandent des doses d'alexine très petites.

### III

#### ACTION DU SÉRUM SPÉCIFIQUE SUR LES VIBRIONS

Dans ce chapitre nous tâcherons d'approfondir le mécanisme par lequel l'immunsérum acquiert le pouvoir anticomplémentaire après avoir été traité par les microbes.

Deux hypothèses se présentent à l'esprit. D'abord, on pourrait supposer que le sérum spécifique possède normalement le pouvoir anticomplémentaire, mais qu'une substance formée pendant le traitement de l'animal empêche ce pouvoir de se manifester. Mis en contact avec les microbes, il cède à ceux-ci ladite substance et dès lors l'action complémentaire a lieu.

Si nous prenons en considération l'existence des antihémolysines dans les sérums normaux et si, d'un autre côté, nous nous rappelons que toutes les cellules enlèvent aux sérums, préparés contre elles, certaines substances, cette hypothèse paraît très plausible.

Malheureusement, dans ce cas particulier, les faits ne parlent pas en sa faveur. De ce que quelques anticorps se fixent sur les cellules, il ne s'ensuit pas que tous agissent de même. Parmi les nombreuses substances qui prennent naissance dans un sérum au cours de sa préparation, il pourrait y en avoir qui, non seulement ne se fixent pas aux cellules, mais enlèvent au contraire à celles-ci des corps qui s'y trouvent normalement. C'est notre seconde hypothèse que nous tâcherons de vérifier.

A la vérité, elle paraît contraire aux idées généralement admises, idées qu'Ehrlich et Bordet ont introduites dans la science et que confirme la manière dont se comportent les agglutinines, les hémolysines et les sels. Mais certains faits,



constatés par divers expérimentateurs, paraissent justifier cette conception, au moins dans quelques cas particuliers.

Pfeiffer et Friedberger <sup>1</sup> ont vu que les sérums normaux, après avoir été mis en contact avec les microbes cholériques ou typhiques, accusent des propriétés bactériolytiques qu'ils ne possédaient pas auparavant. Ils tâchent d'expliquer ce fait en supposant qu'un nouveau corps a été formé dans le sérum normal, après la fixation de ses ambocepteurs naturels par les microbes. Sachs <sup>2</sup>, qui a répété les mêmes expériences au point de vue du pouvoir hémolytique, croit à l'action d'un anticomplément, dont la présence est masquée par la coexistence d'un ambocepteur normal. Ces savants, imbus des idées d'Ehrlich, ont omis de voir ce qui se passe du côté des cellules, après leur contact avec le sérum. Besredka <sup>3</sup>, en mettant du sérum normal de cheval en présence des bacilles typhiques et pesteux desséchés, remarque que, toutes les fois qu'il y a agglutination, l'endotoxine des microbes passe en grande partie dans le sérum, qui devient toxique. Enfin, W. Manwaring <sup>4</sup>, ayant trouvé que le sérum normal de chèvre mis en présence des globules de mouton subit certains changements, a examiné ce que deviennent les globules qui ont été traités avec le sérum et même l'eau physiologique. Ses expériences lui ont montré que ceux-ci se laissent hémolyser plus facilement que les globules normaux dans certaines circonstances.

EXP. 18. — On verse, dans trois tubes à centrifuger, 0,5 c. c. d'eau physiologique et on délaie deux anses de platine d'une culture sur agar du vibron CK. Dans les tubes n° 1 et 2 on ajoute 0,1 c. c. de sérum spécifique et on garde le n° 3 comme témoin. Le tout est mis à l'étuve pendant une

Nos d'ordre.	Sérum spécifique.	Alexine de lapin.	Eau physiologique.	Système hémolytique.	RÉSULTAT APRÈS		
					1 heure.	3 heures.	24 heures.
1	0,1 c. c.	0,4 c. c.	0,6 c. c.	1 c. c.	+	++	+++
2	0,1 c. c.	—	0,5 —	—	0	0	0
3	—	—	0,6 —	—	0	0	+

1. *D. med. Woch.*, n° 1, 1905.

2. *D. med. Woch.*, 4 mai 1905.

3. *An. Inst. Pasteur*, 25 juillet 1905.

4. *Journ. inf. Dis.*, n° 1, 1908.

heure. Après ce laps de temps, les trois tubes sont centrifugés, mais on ne décante que le liquide du premier tube, qu'on remplace par 0,6 c. c. d'eau physiologique. On ajoute, à tous les tubes, 0,4 c. c. d'alexine de lapin, on laisse une heure à l'étuve et on verse le système hémolytique.

Le tube n° 1 hémolyse plus que le témoin, tandis que celui dans lequel le sérum est resté en présence des vibrions n'hémolyse pas du tout. Le sérum mis dans le tube n° 1 a donc entraîné avec lui, après sa décantation, une substance que les vibrions contenaient normalement et qui favorisait l'absorption de l'alexine, sans le concours d'un adjuvant.

Il est à remarquer que cette perte de substance est proportionnelle au pouvoir fixateur que le sérum décanté acquiert.

Exp. 19. — Trois cultures sur agar du vibron CK sont émulsionnées chacune dans 0,6 c. c. d'eau physiologique et versées respectivement dans trois tubes à centrifuger, dont chacun contient 0,4 c. c. de sérum. Une heure d'étuve. Centrifugation et décantation du liquide surnageant, qui est mis dans trois tubes différents, à raison de 0,9 c. c. par tube. Addition de différentes quantités d'alexine, indiquées dans le tableau; une heure d'étuve, puis système hémolytique.

Nos d'ordre.	Dilution du sérum traité.	Dilution du sérum non traité.	Alexine de lapin.	Eau physiologique.	Système hémolytique.	RÉSULTAT APRÈS		
						1 heure.	2 heures.	24 heures.
1	0,9 c. c.	—	0,1 c. c.	—	1 c. c.	O	+	++
2	0,9 —	—	0,08 —	0,02 c. c.	—	O	O	O
3	0,9 —	—	0,05 —	0,05 —	—	O	O	O
4	—	0,9 c. c.	0,05 —	0,05 —	—	+	+++	+++

Sur le dépôt des trois tubes à centrifuger, on verse de la même alexine en quantités diverses et on complète, avec de l'eau physiologique, jusqu'à concurrence de 1 c. c. On met pendant une heure à l'étuve. On fait subir le même traitement à une quatrième culture sur agar du même vibron, qui n'a eu aucun contact avec le sérum et, ensuite, on ajoute à tous les tubes le système hémolytique. Le tube n° 4 sert de témoin.

Nos d'ordre.	Eau physiologique.	Alexine de lapin.	Système hémolytique.	RÉSULTAT APRÈS		
				1 heure.	2 heures.	24 heures.
1	0,9 c. c.	0,1 c. c.	1 c. c.	O	O	O
2	0,8 —	0,2 —	—	O	O	+
3	0,7 —	0,3 —	—	O	+	++
4	0,7 —	0,3 —	—	O	O	+

Exp. 20. — Pour l'expérience suivante, on a délayé 4 anses de platine du

même vibron dans chacun des trois tubes à centrifuger, contenant 0,6 c. c. d'eau physiologique et 0,4 c. c. de sérum spécifique. On laisse reposer une heure dans l'étuve, puis on centrifuge et décante le liquide surnageant, qu'on traite de la même façon que dans l'expérience précédente.

Nos d'ordre.	Dilution du sérum traité	Dilution du sérum non traité.	Alexine de lapin.	Eau physiologique.	SYSTÈME hémolytique.	RÉSULTAT APRÈS		
						1 h.	2 heures.	24 h.
1	0,9 c. c.	—	0,4 c. c.	—	1 c. c.	+++	++++	—
2	0,9 —	—	0,08 —	0,02 c. c.	—	+++	+++	+++
3	0,9 —	—	0,05 —	0,05 —	—	+	+	++
4	—	0,9 c. c.	0,05 —	0,05 —	—	++	++	++

Voici maintenant ce que les dépôts ont donné :

Numéros d'ordre.	Eau physiologique.	Alexine de lapin.	Système hémolytique.	RÉSULTATS APRÈS		
				1 heure.	2 heures.	24 heures
1	0,9 c. c.	0,4 c. c.	1 c. c.	0	0	0
2	0,8 c. c.	0,2 c. c.	1 c. c.	0	0	0
3	0,7 c. c.	0,3 c. c.	1 c. c.	0	0	+
4	0,7 c. c.	0,3 c. c.	1 c. c.	0	0	+

Nous avons cité cette dernière expérience parce qu'elle est significative. Le sérum n'a gagné aucune activité anticomplémentaire par le contact des microbes et les vibrons ont gardé, en entier, le pouvoir de neutraliser le complément, malgré le traitement qu'ils ont subi.

C'est donc le passage de cette substance dans le sérum qui donne à ce dernier le pouvoir anticomplémentaire. La quantité qui est enlevée aux microbes paraît être minime, parce qu'elle n'égale en aucune façon celle que les microbes possèdent normalement. 0,4 c. c. d'alexine absorbée par le sérum est déjà une limite très élevée, tandis que les microbes, en quantité égale à celle qui a servi pour traiter le sérum, peuvent neutraliser 0,3 c. c. et même 0,4 c. c. du même complément. Ceci a de l'importance parce que, quand on ne sépare pas les microbes

du sérum, mais que l'on essaie la réaction en présence de ces deux corps, la quantité d'alexine absorbée est énorme. Elle dépasse souvent le double de la somme que microbes et sérum peuvent fixer chacun séparément.

Exp. 21. — On délaie dans chacun des 9 tubes, deux anses de platine d'une culture de CK et l'on verse, dans les 5 premiers tubes, 0,1 c. c. de sérum cholérique. On laisse le tout à l'étuve pendant une heure; on ajoute les quantités d'alexine indiquées sur le tableau, on remet à l'étuve pendant une heure et on ajoute le système hémolytique.

Nos d'ordre.	Sérum cholérique.	Eau physiologique.	Alexine de lapin	Système hémolytique.	RÉSULTAT APRÈS			
					30 min.	1 heure.	3 heures.	24 heures.
1	0,1 c.c.	0,7 c.c.	0,2 c.c.	1 c. c.	0	0	0	0
2	—	0,6 c.c.	0,3 c.c.	—	0	0	0	0
3	—	0,5 c.c.	0,4 c.c.	—	0	0	0	0
4	—	0,4 c.c.	0,5 c.c.	—	0	0	0	0
5	—	0,3 c.c.	0,6 c.c.	—	0	0	0	0
6	»	0,8 c.c.	0,2 c.c.	—	0	0	0	presque 0
7	»	0,7 c.c.	0,3 c.c.	—	0	0	0	+
8	»	0,6 c.c.	0,4 c.c.	—	0	0	++	+
9	»	0,5 c.c.	0,5 c.c.	—	+	+	++	+++

Ce n'est certainement pas le sérum à lui seul qui fixe le complément; ce ne sont pas non plus les microbes, dépouillés en partie de leur substance fixatrice, qui peuvent absorber cette énorme quantité d'alexine. C'est la combinaison du sérum avec la substance sécrétée par les microbes qui augmente considérablement l'action. Moersch avait donc raison quand il soutenait que le pouvoir anticomplémentaire, pour entrer en fonction, a besoin de deux corps, l'un qui se trouve dans le sang des animaux traités et l'autre qui existe normalement dans l'antigène qui sert au traitement. L'existence de ces deux substances devient évidente dans nos expériences, parce qu'elles nous permettent de dissocier le phénomène.

En employant des cellules microbiennes, au lieu de l'alexine



de chèvre, comme l'a fait Moreschi. il nous a été possible de séparer les deux corps après leur action réciproque et d'étudier les échanges qui ont eu lieu chez chacun d'eux séparément. Nous avons pu voir clairement que le sérum spécifique qui, normalement, n'a aucune action anticomplémentaire, après un contact plus ou moins long avec les microbes, gagne ce pouvoir, tandis que ceux-ci le perdent en partie. Le sérum enlève donc aux vibrions une substance qui a la propriété de neutraliser ou de fixer le complément et qui préexiste dans les derniers.

Nous tenons à faire remarquer que nous employons le terme anticomplémentaire dans son sens le plus large. Pour nous, ce terme signifie que l'action de l'un ou l'autre corps est dirigée contre le complément, sans nous soucier s'il y a fixation ou neutralisation ou tout autre processus.

Mais notre expérience 21 nous montre que la présence simultanée des deux facteurs donne des résultats bien plus prononcés. On y voit que les microbes, à eux seuls, neutralisent à peine 0,2 c. c. d'alexine, tandis qu'en présence du sérum ils en fixent plus de 0.6 c. c. Nous savons, d'un autre côté, que le sérum qui a subi le contact des microbes ne détruit qu'une quantité minime de complément. C'est donc que le sérum enlève aux microbes très peu de substance fixatrice, tandis que, s'il continue à être en contact avec eux, il active d'une façon prononcée la substance qu'ils contiennent.

Ce phénomène présente une grande analogie avec ce que le docteur Richet a appelé anaphylaxie.

Là, comme dans notre cas, l'anticorps, inoffensif, devient actif quand il s'unit à l'antigène; là, comme ici, l'antigène, toxique par lui-même, au lieu d'être neutralisé par l'anticorps, acquiert au contraire une nocivité considérable en sa présence.

#### IV

##### ACTION DU SÉRUM NORMAL

Il nous reste encore un point à éclaircir. Puisque les microbes sont capables de fixer par eux-mêmes une forte quantité d'alexine, comment se fait-il que dans les tubes témoins, de la réaction de Bordet, où l'on remplace le sérum

spécifique par le sérum normal chauffé, il y a une hémolyse presque constante, tout en employant des doses d'alexine inférieures à celle que les microbes peuvent absorber ?

Comparons d'abord le pouvoir d'absorption des microbes en présence du sérum normal et en son absence.

Deux anses de platine d'une culture sur agar du vibrion CK sont délayées dans chaque tube. Le sérum normal de lapin, l'alexine et l'eau physiologique sont versés en même temps et le système hémolytique ajouté après une heure d'étuve.

Nos d'ordre.	Eau physio- logique.	Alexine de lapin.	Sérum normal de lapin	Système hémolytique.	RÉSULTAT APRÈS			
					30 m.	1 heure.	3 heures.	24 heures.
1	0,7 c. c.	0,2 c. c.	0,1 c. c.	1 c. c.	O	O	O	O
2	0,6 —	0,2 —	0,2 —	—	O	O	O	O
3	0,5 —	0,2 —	0,3 —	—	O	O	O	O
4	0,4 —	0,2 —	0,4 —	—	O	O	O	O
5	0,3 —	0,2 —	0,5 —	—	O	+	+	+
6	0,55 —	0,05 —	0,4 —	—	O	O	O	O
7	0,5 —	0,1 —	0,4 —	—	O	O	O	O
8	0,3 —	0,3 —	0,4 —	—	O	+	+	+
9	0,2 —	0,4 —	0,4 —	—	+	+	+	++
10	0,1 —	0,5 —	0,4 —	—	+	+	++	+++
11	0,8 —	0,2 —	—	—	O	O	O	O
12	0,7 —	0,3 —	—	—	O	O	+	+
13	0,5 —	0,5 —	—	—	+	+	+	++

Dans d'autres expériences, et avec le sérum normal chauffé de certains lapins, l'hémolyse commence avec 0, 2 c. c. d'alexine pour 0, 3 c. c. de sérum, tandis que la même quantité des microbes absorbe complètement 0, 3 c. c. d'alexine, si l'on a soin de ne pas ajouter du sérum normal de lapin.

Le sérum normal chauffé favorise donc l'hémolyse. Cette propriété a été signalée par maints auteurs. Nous avons, nous même, constaté dans des expériences inédites, que le sérum chauffé de lapin renforce considérablement l'hémolysine naturelle de cobaye pour les globules de mouton. W. Manwaring a étudié, d'une façon particulière, sur le sérum normal de la

chèvre, ce pouvoir qu'il appelle auxilytique (et que nous nommerions volontiers épilytique, terme plus conforme au génie de la langue grecque).

Mais, à côté de cette action, le sérum normal chauffé possède aussi celle d'empêcher les microbes d'agir sur l'alexine.

Exp. 23. — Dans trois tubes, contenant chacun 0,2 c.c. d'eau physiologique, nous délayons deux anses de platine d'une culture sur agar du vibron CK et nous versons immédiatement après 0,3 c.c. d'alexine de lapin et en même temps, dans le tube n° 1 seulement, 0,5 c.c. de sérum normal de lapin chauffé à 56° pendant une demi-heure. Nous mettons le tout à l'étuve pendant une heure, puis nous ajoutons le système hémolytique, en ayant soin de verser dans le tube n° 2 0,5 c.c. de sérum normal de lapin.

N° d'ordre.	Sérum normal de lapin.	Alexine de lapin.	Eau physiologique.	Système hémolytique.	RÉSULTAT APRÈS			
					30 min.	1 heure.	3 heures.	24 h.
1	0,5 c. c.	0,3 c. c.	0,2 c. c.	1 c. c.	0	0	+	++
2	0,5 c. c.	—	0,2 c. c.	—	0	0	0	0
3	—	—	0,7 c. c.	—	0	0	0	0

Dans le tube n° 1, l'hémolyse est appréciable, tandis que dans le n° 2 il n'y en a pas trace. Le sérum normal, mis en même temps que l'alexine, a empêché celle-ci de se fixer sur les microbes, tandis que dans le tube n° 2 il a été mis trop tard pour exercer une action quelconque.

#### CONCLUSIONS

1° Les vibrions sont capables d'absorber une quantité assez forte d'alexine, sans le concours d'aucun adjuvant;

2° Le sérum spécifique, au contact des vibrions, enlève une partie de la substance que ces derniers contiennent normalement et qui a la propriété d'agir sur l'alexine. C'est cette substance qui, après son passage dans le sérum, confère à celui-ci le pouvoir anticomplémentaire;

3° L'anticorps spécifique du sérum, en se combinant avec elle, active considérablement son action. Il joue par conséquent, envers celle-ci, le rôle de kinase.

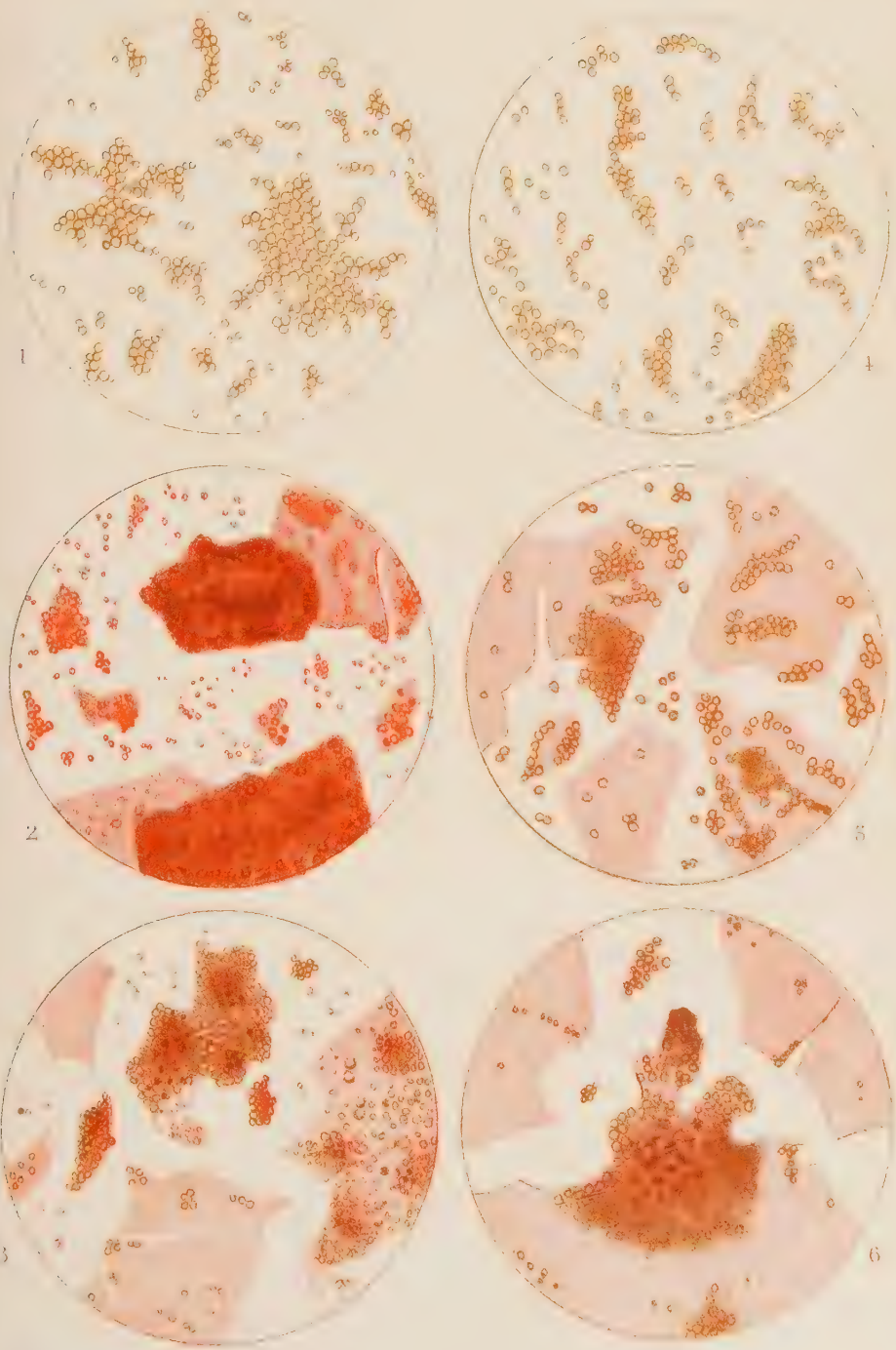
*Le Gérant : G. MASSON.*





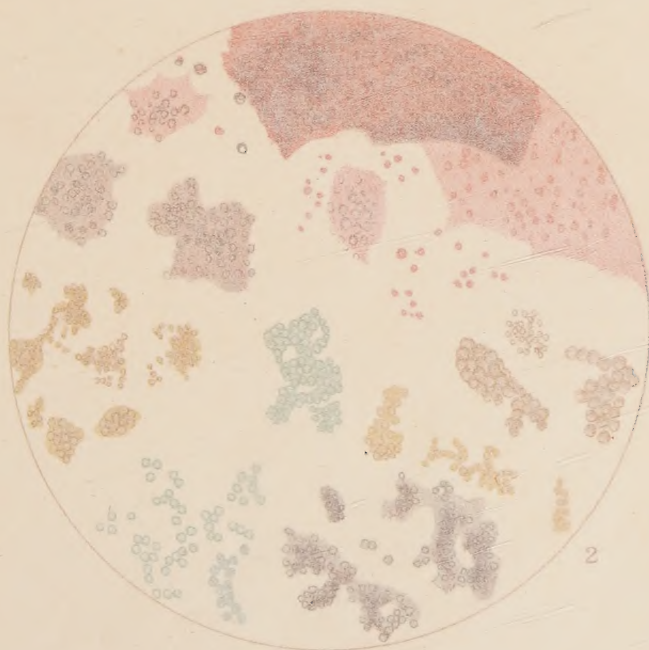




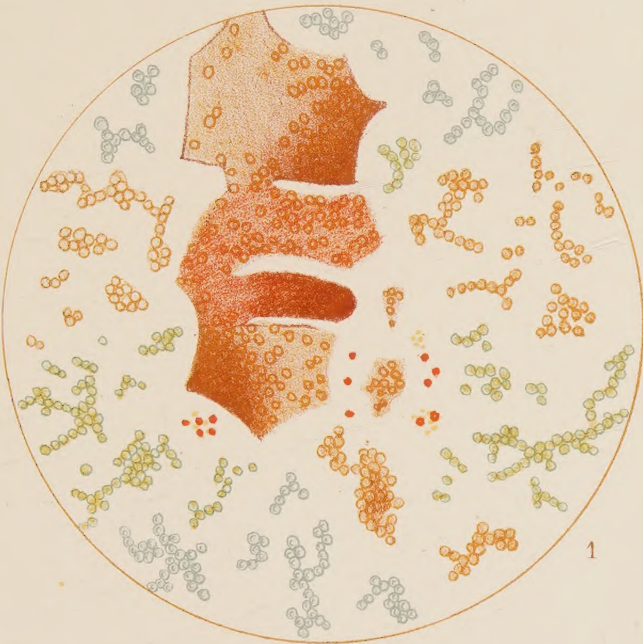




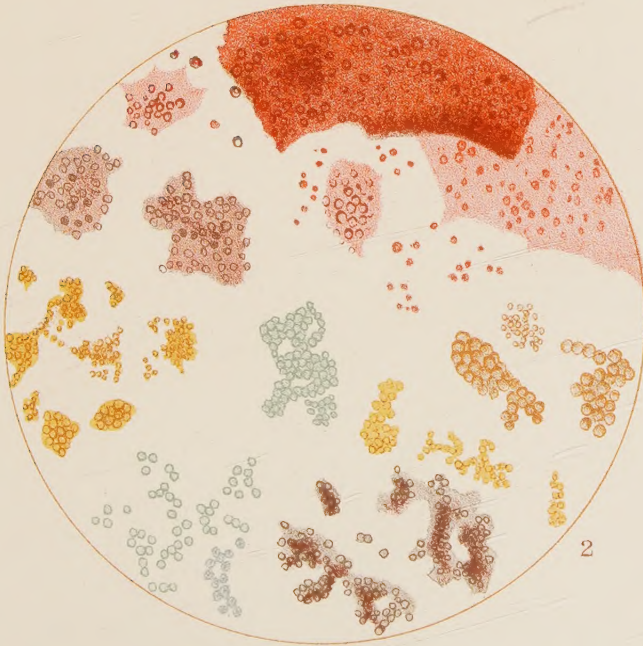








1



2

